

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Année 2018

DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE DÉPISTAGE SALIVAIRES DE L'INFLAMMATION CHEZ LE CHIEN ET LE CHEVAL

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL

Le 27 décembre 2018

par

Clélia, Maud DEBONNE

Née le 25 Décembre 1992 à Rouen (Seine-Maritime)

JURY

Président : Pr. PAIRON

Professeur à la Faculté de Médecine de CRÉTEIL

Membres :

Directeur : Docteur Delphine CLERO, Maître de conférences à l'ENVA

Assesseur : Professeur Céline ROBERT, Professeur à l'ENVA

Liste des membres du corps enseignant

Directeur : Pr Christophe Degueurce

Directeur des formations : Pr Henry Chateau

Directrice de la scolarité et de la vie étudiante : Dr Catherine Colmin

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs C. Pilet, B. Toma, A.-L. Parodi, R. Morallion, J.-P. Cotard, J.-P. Malot & M. Gogny

Département d'Elevage et de Pathologie des Équidés et des Carnivores (DEPEC)

Chef du département : Pr Grandjean Dominique - Adjoint : Pr Blot Stéphane

| | |
|--|---|
| <p>Unité pédagogique d'anesthésie, réanimation, urgences, soins intensifs</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Fernandez Parra Rocío, Maître de conférences associée - Dr Verwaerde Patrick, Maître de conférences (convention EnvT) <p>Unité pédagogique de clinique équine</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Audigé Fabrice - Dr Bertoni Lélia, Maître de conférences - Dr Bourzat Céline, Chargée d'enseignement contractuelle - Dr Coudry Virginie, Praticien hospitalier - Pr Denoix Jean-Marie - Dr Giraudet Aude, Praticien hospitalier - Dr Herout Valentin, Chargé d'enseignement contractuel - Dr Jacquot Sandrine, Praticien hospitalier - Dr Mespoulèdes-Rivière Céline, Praticien hospitalier* - Dr Melroud Claire, Praticien hospitalier <p>Unité pédagogique de médecine et imagerie médicale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Benchekroun Ghita, Maître de conférences - Pr Blot Stéphane* - Dr Canonne-Guibert Morgane, Chargée d'enseignement contractuelle - Dr Franche-Legros Véronique, Praticien hospitalier - Dr Maurey-Guinec Christelle, Maître de conférences | <p>Unité pédagogique de médecine de l'élevage et du sport</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Clerc Delphine, Maître de conférences - Dr Fontbonne Alain, Maître de conférences - Pr Grandjean Dominique* - Dr Maenhoudt Cindy, Praticien hospitalier - Dr Nudelmann Nicolas, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de pathologie chirurgicale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Fayolle Pascal - Dr Manassero Mathieu, Maître de conférences - Pr Viateau-Duval Véronique* <p>Discipline : cardiologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Chetboul Valérie <p>Discipline : ophtalmologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Chahory Sabine, Maître de conférences <p>Discipline : nouveaux animaux de compagnie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Pignon Charly, Praticien hospitalier |
|--|---|

Département des Productions Animales et de Santé Publique (DPASP)

Chef du département : Pr Millermann Yves - Adjoint : Pr Dufour Barbara

| | |
|--|--|
| <p>Unité pédagogique d'hygiène, qualité et sécurité des aliments</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Augustin Jean-Christophe* - Dr Bolnot François, Maître de conférences - Pr Carlier Vincent <p>Unité pédagogique de maladies réglementées, zoonoses et épidémiologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Crozet Guillaume, Chargé d'enseignement contractuel - Pr Dufour Barbara* - Pr Haddad/Hoang-Xuan Nadia - Dr Rivière Julie, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de pathologie des animaux de production</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Adjou Karim - Dr Belibis Guillaume, Maître de conférences* - Dr Delbart Maxime, Maître de conférences associé - Dr Dennis Marine, Chargée d'enseignement contractuelle - Pr Millermann Yves - Dr Plassard Vincent, Praticien hospitalier - Dr Ravary-Plumioën Bérangère, Maître de conférences | <p>Unité pédagogique de reproduction animale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Constant Fabienne, Maître de conférences* - Dr Desbois Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - Dr Mauffré Vincent, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de zootechnie, économie rurale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Armé Pascale, Maître de conférences - Pr Bossé Philippe* - Dr De Paula Reis Alline, Maître de conférences - Pr Grimard-Balif Bénédicte - Dr Leroy-Barassin Isabelle, Maître de conférences - Pr Ponter Andrew - Dr Wolgut Véronique, Praticien hospitalier |
|--|--|

Département des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques (DSBP)

Chef du département : Pr Desquibet Loïc - Adjoint : Pr Pilot-Storck Fanny

| | |
|--|--|
| <p>Unité pédagogique d'anatomie des animaux domestiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Brossard Emilie, Chargée d'enseignement contractuelle - Pr Chateau Henry - Pr Crevier-Denoix Nathalie - Pr Robert Céline* <p>Unité pédagogique de bactériologie, immunologie, virologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Boulois Henri-Jean - Pr Elot Marc - Dr Lagree Anne-Claire, Maître de conférences - Pr Le Poder Sophie - Dr Le Roux Delphine, Maître de conférences * <p>Unité pédagogique de biochimie, biologie clinique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Bellier Sylvain* - Dr Lagrange Isabelle, Praticien hospitalier - Dr Michaux Jean-Michel, Maître de conférences <p>Unité pédagogique d'histologie, anatomie pathologique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Cordonnier-Lefort Nathalie, Maître de conférences - Pr Fontaine Jean-Jacques - Dr Laloy Eve, Maître de conférences - Dr Reyes-Gomez Edouard, Maître de conférences* <p>Unité pédagogique de management, communication, outils scientifiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mme Conan Muriel, Professeur certifié (Anglais) - Pr Desquibet Loïc, (Biostatistique, Épidémiologie) - Dr Margnac Geneviève, Maître de conférences | <p>Unité de parasitologie, maladies parasitaires, dermatologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Blaga Radu, Maître de conférences (rattaché au DPASP) - Dr Briand Amaury, Assistant d'Enseignement et de Recherche Contractuel (rattaché au DEPEC) - Dr Cochet-Faivre Noëlle, Praticien hospitalier (rattachée au DEPEC) - Pr Guillot Jacques* - Dr Polack Bruno, Maître de conférences - Dr Risco-Castillo Véronica, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de pharmacie et toxicologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Kohlhauer Matthias, Maître de conférences - Dr Perrot Sébastien, Maître de conférences* - Pr Tissier Renaud <p>Unité pédagogique de physiologie, éthologie, génétique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Chevallier Lucie, Maître de conférences (Génétique) - Dr Crépeaux Guillemette, Maître de conférences (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Gilbert Caroline (Ethologie) - Pr Pilot-Storck Fanny (Physiologie, Pharmacologie)* - Pr Tiret Laurent (Physiologie, Pharmacologie)* <p>Discipline : éducation physique et sportive</p> <ul style="list-style-type: none"> - M. Philips Pascal, Professeur certifié |
|--|--|

* responsable d'unité pédagogique

Professeurs émerites :

Mmes et MM. : Bénet Jean-Jacques, Chermette René, Combrisson Hélène, Enriquez Brigitte, Niebauer Gert, Panthier Jean-Jacques, Paragon Bernard.

REMERCIEMENTS

Au Professeur de la faculté de Médecine de Créteil,

Qui m'a fait l'honneur de présider mon jury de thèse, hommage respectueux.

A Madame Delphine CLERO,

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, qui m'a fait l'honneur d'accepter de diriger cette thèse, merci pour sa bienveillance, son aide et son soutien dans la réalisation de ce travail.

A Madame Céline ROBERT,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, qui a accepté d'être l'assesseur de cette thèse, remerciements respectueux.

A Monsieur Loïc DESQUILBET,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, qui m'a beaucoup aidée dans la réalisation des analyses statistiques, merci de votre implication et de votre réactivité.

A Monsieur Fathi DRISS,

Pour son aide dans la réalisation de ce travail, remerciements respectueux.

A Madame Karine REYNAUD,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, pour m'avoir permis de réaliser mes prélèvements sur les Beagles du laboratoire de reproduction de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.

A la SHEVA,

Pour m'avoir permis de réaliser mes prélèvements sur leurs chevaux.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|----|
| TABLE DES MATIÈRES | 1 |
| TABLE DES ILLUSTRATIONS | 6 |
| TABLE DES TABLEAUX | 9 |
| TABLE DES ANNEXES | 11 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 12 |
| INTRODUCTION | 13 |
| 1. PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE | 15 |
| 1.1. Les neutrophiles et leurs implications dans la réaction inflammatoire..... | 15 |
| 1.1.1. Rappels sur la réaction inflammatoire | 15 |
| 1.1.1.1. Définition..... | 15 |
| 1.1.1.2. Etiologie | 15 |
| 1.1.1.3. Déroulement général des différentes étapes de la réaction inflammatoire | |
| 16 | |
| 1.1.1.3.1. Réaction vasculo-exsudative | 16 |
| 1.1.1.3.2. Réaction cellulaire..... | 16 |
| 1.1.1.3.3. Déterioration | 17 |
| 1.1.1.3.4. Réparation et cicatrisation..... | 17 |
| 1.1.2. La formation des neutrophiles lors de l'hématopoïèse | 18 |
| 1.1.3. Les neutrophiles et leur migration jusqu'au site inflammatoire | 19 |
| 1.1.4. Le rôle de phagocytose des neutrophiles | 20 |
| 1.1.4.1. La formation du phagosome..... | 21 |
| 1.1.4.2. La production d'oxydants dans le phagosome | 22 |
| 1.1.5. L'activation des neutrophiles et leur impact sur le site inflammatoire..... | 22 |
| 1.1.6. Les granules des neutrophiles | 23 |
| 1.1.6.1. Présentation | 23 |
| 1.1.6.2. La dégranulation des neutrophiles : libération de la myéloperoxydase .. | 25 |
| 1.2. Structure et rôles de la myéloperoxydase | 26 |
| 1.2.1. Histoire | 26 |
| 1.2.2. Structure et synthèse | 26 |

| | |
|---|----|
| 1.2.2.1. MPO humaine..... | 26 |
| 1.2.2.1.1. Structure de la myéloperoxydase | 26 |
| 1.2.2.1.2. Synthèse de la myéloperoxydase | 27 |
| 1.2.2.2. MPO équine..... | 28 |
| 1.2.3. Lieu de stockage | 28 |
| 1.2.4. Activité enzymatique et régulation..... | 29 |
| 1.2.4.1. Activité enzymatique..... | 29 |
| 1.2.4.1.1. L'activité peroxydase | 29 |
| 1.2.4.1.2. L'activité de chloration | 29 |
| 1.2.4.1.3. Réactions annexes | 30 |
| 1.2.4.1.4. Bilan sur les réactions enzymatiques catalysées par la myéloperoxydase | 30 |
| 1.2.4.2. Espèces oxydantes produites par la myéloperoxydase | 31 |
| 1.2.4.3. Régulation | 33 |
| 1.2.5. Rôle dans l'organisme | 34 |
| 1.2.5.1. Activité antimicrobienne | 34 |
| 1.2.5.2. Activité sur le système inflammatoire | 35 |
| 1.2.5.3. Activité cytotoxique : un effet délétère pour l'organisme..... | 36 |
| 1.2.5.4. Agent modulateur des fonctions cellulaires | 36 |
| 1.2.5.5. Déficience en MPO | 39 |
| 1.3. Milieu de dosage et intérêts cliniques du dosage de la MPO | 41 |
| 1.3.1. Purification de la MPO : une étape préalable nécessaire aux différentes méthodes de dosage | 41 |
| 1.3.2. Méthodes et milieu de dosage..... | 41 |
| 1.3.2.1. Plasma | 41 |
| 1.3.2.1.1. Composition..... | 41 |
| 1.3.2.1.2. Méthode de mesure de MPO..... | 42 |
| 1.3.2.1.3. Concentration en MPO chez les chevaux sains | 43 |
| 1.3.2.2. Muscle | 44 |
| 1.3.2.3. Salive | 45 |
| 1.3.2.3.1. Composition salivaire | 45 |

| | |
|--|----|
| 1.3.2.3.2. Sécrétion salivaire | 46 |
| 1.3.2.3.3. Dosage de la MPO dans la salive | 47 |
| 1.3.2.4. Autres fluides biologiques..... | 48 |
| 1.3.2.5. Dosage indirect de l'activité de la MPO | 49 |
| 1.3.3. Intérêt clinique du dosage de la myéloperoxydase | 49 |
| 1.3.3.1. Chez l'homme | 49 |
| 1.3.3.1.1. Maladies cardiaques | 49 |
| 1.3.3.1.1.1. Athérosclérose | 51 |
| 1.3.3.1.1.2. Insuffisance valvulaire mitrale | 53 |
| 1.3.3.1.1.3. Syndrome coronarien aigu et maladie ischémique cardiaque .. | 53 |
| 1.3.3.1.1.4. Risque cardiovasculaire chez les enfants obèses | 54 |
| 1.3.3.1.2. Maladies auto-immunes : arthrite rhumatoïde | 54 |
| 1.3.3.1.3. Maladie d'Alzheimer | 55 |
| 1.3.3.1.4. Maladies rénales..... | 55 |
| 1.3.3.1.5. Infections (tractus urinaire, maladie parodontale) | 57 |
| 1.3.3.1.5.1. Tractus urinaire | 57 |
| 1.3.3.1.5.2. Maladie parodontale..... | 57 |
| 1.3.3.1.6. Suivi des exercices physiques | 58 |
| 1.3.3.2. Chez le cheval | 59 |
| 1.3.3.2.1. Ischémie reperfusion lors de torsion intestinale..... | 59 |
| 1.3.3.2.2. Suivi des exercices physiques | 60 |
| 2. DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE | 63 |
| 2.1. Contexte et objectif de l'étude | 63 |
| 2.2. Matériel et méthode | 64 |
| 2.2.1. Animaux prélevés | 64 |
| 2.2.1.1. Les chiens | 64 |
| 2.2.1.2. Les chevaux | 66 |
| 2.2.2. Principe du test | 66 |
| 2.2.2.1. Utilisation initiale des bandelettes HEMASTIX | 66 |
| 2.2.2.2. Principe chimique du test | 67 |

| | |
|---|----|
| 2.2.3. Prélèvements..... | 67 |
| 2.2.3.1. Méthodes de prélèvements et de traitement du prélèvement | 67 |
| 2.2.3.1.1. Méthode 1 | 67 |
| 2.2.3.1.2. Méthode 2 | 67 |
| 2.2.3.1.3. Méthode 3 | 68 |
| 2.2.3.1.4. Méthode 4 | 68 |
| 2.2.3.2. Planning de réalisation des prélèvements..... | 68 |
| 2.2.3.2.1. Chez le chien..... | 68 |
| 2.2.3.2.2. Chez le cheval | 68 |
| 2.2.4. Lecture des résultats | 69 |
| 2.2.4.1. Comparaison à l'échelle colorimétrique et corrélation avec la quantité de MPO dans la salive | 69 |
| 2.2.4.2. Etablissement d'un système binaire pour l'étude du coefficient Kappa .. | 71 |
| 2.2.5. Analyse statistique des résultats | 71 |
| 2.2.5.1. Coefficient de Lin..... | 72 |
| 2.2.5.2. Méthode de Bland et Altman (Bland et Altman, 1999; Giavarina, 2015)73 | 73 |
| 2.2.5.3. Coefficient kappa | 74 |
| 2.3. Résultats..... | 76 |
| 2.3.1. Chez le chien..... | 76 |
| 2.3.1.1. Répétabilité..... | 76 |
| 2.3.1.1.1. Méthode 1 | 76 |
| 2.3.1.1.2. Méthode 2 | 79 |
| 2.3.1.1.3. Méthode 3 | 81 |
| 2.3.1.1.4. Méthode 4 | 83 |
| 2.3.1.1.5. Bilan sur la répétabilité | 86 |
| 2.3.1.2. Reproductibilité..... | 86 |
| 2.3.2. Chez le cheval..... | 89 |
| 2.3.2.1. Répétabilité..... | 89 |
| 2.3.2.1.1. Méthode 1 | 89 |
| 2.3.2.1.2. Méthode 2 | 91 |
| 2.3.2.1.3. Méthode 3 | 94 |

| | |
|---|-----|
| 2.3.2.1.4. Méthode 4 | 96 |
| 2.3.2.1.5. Bilan sur la répétabilité | 99 |
| 2.3.2.2. Reproductibilité | 99 |
| 2.3.2.2.1. Méthode 1 | 99 |
| 2.3.2.2.2. Méthode 2 | 101 |
| 2.3.2.2.3. Méthode 3 | 103 |
| 2.3.2.2.4. Méthode 4 | 106 |
| 2.3.2.2.5. Bilan sur la reproductibilité..... | 108 |
| 2.4. Discussion..... | 109 |
| 2.4.1. Technique de prélèvements | 109 |
| 2.4.2. Méthode de dosage choisie..... | 111 |
| 2.4.3. Evaluation des résultats en fonction de la méthode statistique choisie | 111 |
| 2.4.4. Comparaison des deux espèces..... | 112 |
| 2.5. Conclusion de la partie expérimentale..... | 112 |
| CONCLUSION..... | 115 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 117 |
| ANNEXES..... | 125 |

TABLE DES ILLUSTRATIONS

| | |
|--|----|
| FIGURE 1 : SCHEMA RECAPITULATIF DES DIFFERENTES ETAPES DE L'INFLAMMATION (REALISATION PERSONNELLE) | 18 |
| FIGURE 2 : DEROULEMENT DE L'HEMATOPOIESE, DIFFERENCIATION DES NEUTROPHILES (D'APRES CORDONNIER, 2016). | 19 |
| FIGURE 3 : MIGRATION DES NEUTROPHILES JUSQU'AU SITE INFLAMMATOIRE (D'APRES ABBAS <i>ET AL.</i> , 2015) | 20 |
| FIGURE 4 : MODELE DE FUSION DU PHAGOSOME AVEC LES ENDOSOMES (TJELLE <i>ET AL.</i> , 2000)..... | 21 |
| FIGURE 5 : ETAPES DE LA GRANULOPOIESE (D'APRES COWLAND ET BORREGAARD, 2016)..... | 24 |
| FIGURE 6 : STRUCTURE DU NOYAU HEMIQUE DE LA MPO HUMAINE (D'APRES SERTEYN <i>ET AL.</i> , 2003)..... | 27 |
| FIGURE 7 : ETAPES DETAILLÉES DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA MPO (SERTEYN <i>ET AL.</i> , 2003)..... | 31 |
| FIGURE 8 : REACTIONS OXYDANTES POSSIBLES SUITE A LA STIMULATION DES NEUTROPHILES..... | 33 |
| FIGURE 9 : COMPOSITION DU SANG APRES CENTRIFUGATION (D'APRES KLEIN, 2013)..... | 42 |
| FIGURE 10 : COURBES STANDARD DE RADIO-IMMUNOLOGIE POUR LA MPO EQUINE OBTENUES A PARTIR DE MPO MARQUEE DEPUIS 4 JOURS (RONDS) OU DEPUIS 30 JOURS (CARRÉS) (DEBY-DUPONT <i>ET AL.</i> , 1998)..... | 43 |
| FIGURE 11 : PRINCIPALES GLANDES SALIVAIRES CHEZ LE CHIEN (D'APRES AKERS ET DENBOW, 2013B) | 46 |
| FIGURE 12 : IMPACT DE LA MPO SUR LE SYSTEME VASCULAIRE (D'APRES NUSSBAUM <i>ET AL.</i> , 2013)..... | 50 |
| FIGURE 13 : CONTRIBUTION DE LA MPO AU DYSFONCTIONNEMENT CARDIOVASCULAIRE ET MYOCARDIQUE (NUSSBAUM <i>ET AL.</i> , 2013) | 51 |
| FIGURE 14 : ROLES DE LA MPO ET DE SES DERIVES DANS L'INSTABILITE DES PLAQUES D'ATHEROSCLEROSE (D'APRES TENG <i>ET AL.</i> , 2017) | 53 |
| FIGURE 15 : COMPARAISON DE L'ACTIVITE SALIVAIRES DE LA MPO ENTRE DES PATIENTS SAINS, DES PATIENTS ATTEINTS DE GINGIVITE ET DES PATIENTS ATTEINTS DE PARODONTITE (D'APRES KLANGPRAPAN <i>ET AL.</i> , 2016). | 58 |
| FIGURE 16 : EXEMPLE DE LECTURE DE RESULTAT (TRACES) | 69 |
| FIGURE 17 : REGROUPEMENT DES RESULTATS EN SYSTEME BINAIRE..... | 71 |
| FIGURE 18 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DES MESURES SUR 16 PRELEVEMENTS SALIVAIRES DE CHIENS AVEC LA PREMIERE METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE), AVEC EN ABSISSE LA VALEUR MESUREE DANS LE PREMIER ECHANTILLON ET EN ORDONNÉE LA VALEUR MESUREE DANS LE SECOND ECHANTILLON. LA DROITE A 45° REPRESENTE LA CONCORDANCE PARFAITE – ETUDE DE LA REPETABILITE CHEZ LE CHIEN | 77 |
| FIGURE 19 : GRAPHIQUE DE BLAND ET ALTMAN REPRESENTANT LA CONCORDANCE DES MESURES ENTRE LE PREMIER PRELEVEMENT ET LE SECONDE PRELEVEMENT PAR LA PREMIERE METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPETABILITE | 77 |
| FIGURE 20 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DU COEFFICIENT DE LIN POUR LA DEUXIÈME METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPETABILITE CHEZ LE CHIEN..... | 79 |

| | |
|--|----|
| FIGURE 21 : GRAPHIQUE DE BLAND ET ALTMAN REPRESENTANT LA CONCORDANCE DES MESURES ENTRE LE PREMIER PRELEVEMENT ET LE SECOND PRELEVEMENT PAR LA DEUXIEME METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPETABILITE CHEZ LE CHIEN | 80 |
| FIGURE 22 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DU COEFFICIENT DE LIN POUR LA TROISIEME METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPETABILITE CHEZ LE CHIEN | 81 |
| FIGURE 23 : GRAPHIQUE DE BLAND ET ALTMAN REPRESENTANT LA CONCORDANCE DES MESURES ENTRE LE PREMIER PRELEVEMENT ET LE SECOND PRELEVEMENT PAR LA TROISIEME METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPETABILITE CHEZ LE CHIEN | 82 |
| FIGURE 24 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DU COEFFICIENT DE LIN POUR LA QUATRIEME METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPETABILITE CHEZ LE CHIEN | 84 |
| FIGURE 25 : GRAPHIQUE DE BLAND ET ALTMAN REPRESENTANT LA CONCORDANCE DES MESURES ENTRE LE PREMIER PRELEVEMENT ET LE SECOND PRELEVEMENT PAR LA QUATRIEME METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPETABILITE CHEZ LE CHIEN | 85 |
| FIGURE 26 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DU COEFFICIENT DE LIN POUR LA QUATRIEME METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE CHEZ LE CHIEN | 87 |
| FIGURE 27 : GRAPHIQUE DE BLAND ET ALTMAN REPRESENTANT LA CONCORDANCE DES MESURES ENTRE LE PREMIER PRELEVEMENT ET LE SECOND PRELEVEMENT PAR LA QUATRIEME METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE CHEZ LE CHIEN | 88 |
| FIGURE 28 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DU COEFFICIENT DE LIN POUR LA PREMIERE METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPETABILITE CHEZ LE CHEVAL..... | 90 |
| FIGURE 29 : GRAPHIQUE DE BLAND ET ALTMAN REPRESENTANT LA CONCORDANCE DES MESURES ENTRE LE PREMIER PRELEVEMENT ET LE SECOND PRELEVEMENT PAR LA PREMIERE METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPETABILITE CHEZ LE CHEVAL..... | 90 |
| FIGURE 30 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DU COEFFICIENT DE LIN POUR LA DEUXIEME METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPETABILITE CHEZ LE CHEVAL..... | 92 |
| FIGURE 31 : GRAPHIQUE DE BLAND ET ALTMAN REPRESENTANT LA CONCORDANCE DES MESURES ENTRE LE PREMIER PRELEVEMENT ET LE SECOND PRELEVEMENT PAR LA DEUXIEME METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPETABILITE CHEZ LE CHEVAL..... | 93 |
| FIGURE 32 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DU COEFFICIENT DE LIN POUR LA TROISIEME METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPETABILITE CHEZ LE CHEVAL..... | 94 |
| FIGURE 33 : GRAPHIQUE DE BLAND ET ALTMAN REPRESENTANT LA CONCORDANCE DES MESURES ENTRE LE PREMIER PRELEVEMENT ET LE SECOND PRELEVEMENT PAR LA TROISIEME METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPETABILITE CHEZ LE CHEVAL..... | 95 |
| FIGURE 34 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DU COEFFICIENT DE LIN POUR LA QUATRIEME METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPETABILITE CHEZ LE CHEVAL..... | 97 |

| | |
|---|-----|
| FIGURE 35 : GRAPHIQUE DE BLAND ET ALTMAN REPRESENTANT LA CONCORDANCE DES MESURES ENTRE LE PREMIER PRELEVEMENT ET LE SECOND PRELEVEMENT PAR LA QUATRIEME METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPETABILITE CHEZ LE CHEVAL..... | 97 |
| FIGURE 36 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DU COEFFICIENT DE LIN POUR LA PREMIERE METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE CHEZ LE CHEVAL..... | 99 |
| FIGURE 37 : GRAPHIQUE DE BLAND ET ALTMAN REPRESENTANT LA CONCORDANCE DES MESURES ENTRE LE PREMIER PRELEVEMENT ET LE SECOND PRELEVEMENT PAR LA PREMIERE METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE CHEZ LE CHEVAL | 100 |
| FIGURE 38: REPRESENTATION GRAPHIQUE DU COEFFICIENT DE LIN POUR LA DEUXIEME METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE CHEZ LE CHEVAL..... | 102 |
| FIGURE 39 : GRAPHIQUE DE BLAND ET ALTMAN REPRESENTANT LA CONCORDANCE DES MESURES ENTRE LE PREMIER PRELEVEMENT ET LE SECOND PRELEVEMENT PAR LA DEUXIEME METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE CHEZ LE CHEVAL | 102 |
| FIGURE 40 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DU COEFFICIENT DE LIN POUR LA TROISIEME METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE CHEZ LE CHEVAL..... | 104 |
| FIGURE 41 : GRAPHIQUE DE BLAND ET ALTMAN REPRESENTANT LA CONCORDANCE DES MESURES ENTRE LE PREMIER PRELEVEMENT ET LE SECOND PRELEVEMENT PAR LA TROISIEME METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE CHEZ LE CHEVAL | 105 |
| FIGURE 42 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DU COEFFICIENT DE LIN POUR LA QUATRIEME METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE CHEZ LE CHEVAL | 106 |
| FIGURE 43 : GRAPHIQUE DE BLAND ET ALTMAN REPRESENTANT LA CONCORDANCE DES MESURES ENTRE LE PREMIER PRELEVEMENT ET LE SECOND PRELEVEMENT PAR LA QUATRIEME METHODE A 30 SECONDES (A GAUCHE) ET A 120 SECONDES (A DROITE) – ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE CHEZ LE CHEVAL | 107 |

TABLE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| TABLEAU 1 : EFFETS DE LA MYELOPEROXYDASE ET LEURS CONSEQUENCES PATHOLOGIQUES (D'APRES RUTGERS <i>ET AL.</i> , 2003) | 38 |
| TABLEAU 2 : COMPARAISON DES CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET BIOLOGIQUES DES PATIENTS ATTEINTS DE DEFICIENCE EN MPO PRIMAIRE OU SECONDAIRE. | 40 |
| TABLEAU 3 : CARACTERISTIQUES DES CHIENS AU MOMENT DU PRELEVEMENT POUR TESTER CHAQUE METHODE. | 65 |
| TABLEAU 4 : CARACTERISTIQUES DES CHEVAUX AU MOMENT DU PRELEVEMENT POUR TESTER CHAQUE METHODE. | 66 |
| TABLEAU 5: CORRESPONDANCE ENTRE LE RESULTAT DE LA BANDELETTE ET LA QUANTITE DE MPO CONTENUE DANS LA SALIVE.... | 70 |
| TABLEAU 6 : INTERPRETATION DES VALEURS DU COEFFICIENT DE CONCORDANCE DE LIN (CC LIN) (PARTIK <i>ET AL.</i> , 2002)..... | 73 |
| TABLEAU 7 : INTERPRETATION DES VALEURS DU KAPPA (LANDIS ET KOCH, 1977) | 75 |
| TABLEAU 8 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 1 A 30 SECONDES..... | 78 |
| TABLEAU 9 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 1 A 120 SECONDES..... | 78 |
| TABLEAU 10 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 2 A 30 SECONDES..... | 80 |
| TABLEAU 11 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 2 A 120 SECONDES..... | 81 |
| TABLEAU 12: REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 3 A 30 SECONDES..... | 83 |
| TABLEAU 13 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 3 A 120 SECONDES..... | 83 |
| TABLEAU 14 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 4 A 30 SECONDES..... | 85 |
| TABLEAU 15 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 4 A 120 SECONDES..... | 85 |
| TABLEAU 16 : REPETABILITE DE CHAQUE METHODE SELON L'ANALYSE STATISTIQUE CHEZ LE CHIEN | 86 |
| TABLEAU 17 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 4 A 30 SECONDES..... | 88 |
| TABLEAU 18 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 4 A 120 SECONDES..... | 89 |
| TABLEAU 19 : BILAN SUR LA REPRODUCTIBILITE DE LA METHODE 4 CHEZ LE CHIEN | 89 |
| TABLEAU 20 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 1 A 30 SECONDES – ETUDE DE LA REPETABILITE CHEZ LE CHEVAL | 91 |
| TABLEAU 21 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 1 A 120 SECONDES – ETUDE DE LA REPETABILITE CHEZ LE CHEVAL | 91 |
| TABLEAU 22 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 2 A 30 SECONDES – ETUDE DE LA REPETABILITE CHEZ LE CHEVAL | 93 |
| TABLEAU 23 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 2 A 120 SECONDES – ETUDE DE LA REPETABILITE CHEZ LE CHEVAL | 94 |
| TABLEAU 24 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 3 A 30 SECONDES – ETUDE DE LA REPETABILITE CHEZ LE CHEVAL | 96 |
| TABLEAU 25 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 3 A 120 SECONDES – ETUDE DE LA REPETABILITE CHEZ LE CHEVAL | 96 |

| | |
|---|-----|
| TABLEAU 26 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 4 A 30 SECONDES – ETUDE DE LA REPETABILITE CHEZ LE CHEVAL | 98 |
| TABLEAU 27 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 4 A 120 SECONDES – ETUDE DE LA REPETABILITE CHEZ LE CHEVAL | 98 |
| TABLEAU 28 : REPETABILITE DE CHAQUE METHODE SELON L'APPROCHE STATISTIQUE CHOISIE CHEZ LE CHEVAL..... | 99 |
| TABLEAU 29: REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 1 A 30 SECONDES – ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE CHEZ LE CHEVAL | 101 |
| TABLEAU 30 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 1 A 120 SECONDES – ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE CHEZ LE CHEVAL | 101 |
| TABLEAU 31 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 2 A 30 SECONDES – ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE CHEZ LE CHEVAL | 103 |
| TABLEAU 32 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 2 A 120 SECONDES – ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE CHEZ LE CHEVAL | 103 |
| TABLEAU 33 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 3 A 30 SECONDES – ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE CHEZ LE CHEVAL | 105 |
| TABLEAU 34 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 3 A 120 SECONDES – ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE CHEZ LE CHEVAL | 105 |
| TABLEAU 35 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 4 A 30 SECONDES – ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE CHEZ LE CHEVAL | 108 |
| TABLEAU 36 : REPARTITION DES RESULTATS SELON LE PRELEVEMENT PAR LA METHODE 4 A 120 SECONDES – ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE CHEZ LE CHEVAL | 108 |
| TABLEAU 37 : REPRODUCTIBILITE DE CHAQUE METHODE SELON L'APPROCHE STATISTIQUE CHOISIE CHEZ LE CHEVAL | 108 |

TABLE DES ANNEXES

| | |
|---|-----|
| ANNEXE 1: NOTICE DES BANDELETTES HEMASTIX..... | 125 |
| ANNEXE 2 : FEUILLE DE PRISE DE NOTE LORS DES PRELEVEMENTS | 126 |
| ANNEXE 3 : RESULTATS DES PRELEVEMENTS CHEZ LE CHIEN, BANDELETTES ET ECOUVILLONS, 30.01.2018, PREMIERE PARTIE - ETUDE DE LA REPETABILITE..... | 127 |
| ANNEXE 4 : RESULTATS DES PRELEVEMENTS CHEZ LE CHIEN, BANDELETTES ET ECOUVILLONS, 30.01.2018, DEUXIEME PARTIE - ETUDE DE LA REPETABILITE | 128 |
| ANNEXE 5 : RESULTATS DES PRELEVEMENTS CHEZ LE CHIEN, DILUTIONS, 30.01.2018, PREMIERE PARTIE - ETUDE DE LA REPETABILITE | 129 |
| ANNEXE 6 : RESULTATS DES PRELEVEMENTS CHEZ LE CHIEN, DILUTIONS, 30.01.2018, DEUXIEME PARTIE - ETUDE DE LA REPETABILITE | 130 |
| ANNEXE 7 : RESULTATS DES PRELEVEMENTS CHEZ LE CHIEN, 09.11.2017, PREMIERE PARTIE - ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE...131 | |
| ANNEXE 8 : RESULTATS DES PRELEVEMENTS CHEZ LE CHIEN, 09.11.2017, DEUXIEME PARTIE - ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE ..132 | |
| ANNEXE 9 : RESULTATS DES PRELEVEMENTS CHEZ LE CHIEN, 10.11.2017, PREMIERE PARTIE - ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE...133 | |
| ANNEXE 10 : RESULTATS DES PRELEVEMENTS CHEZ LE CHIEN, 10.11.2017, DEUXIEME PARTIE - ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE 134 | |
| ANNEXE 11 : RESULTATS DES PRELEVEMENTS CHEZ LE CHEVAL, BANDELETTES ET ECOUVILLONS, 01.03.18, PREMIERE PARTIE - ETUDE DE LA REPETABILITE ET DE LA REPRODUCTIBILITE..... | 135 |

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN : Acide Désoxyribonucléique
- ARN : Acide Ribonucléique
- ARNm : Acide Ribonucléique messager
- ATP : Adénosine Triphosphate
- CK : Créatine Kinase
- CRP : Protéine C Réactive
- ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay
- FEI : Fédération d'Equitation Internationale
- FFE : Fédération Française d'Equitation
- FFST: Fédération Française de Sport de Traineau, Ski-Joering, Bike-joering
- IL1 β : Interleukine 1 β
- LDL : Lipoprotéine de basse densité
- MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
- MMP-9 : Matrice Métalloprotéinase-9
- MPO : myéloperoxydase
- NADPH oxydase : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate oxydase sous forme réduite
- NF- κ B : Facteur Nucléaire κ B
- NGAL : lipocaline associée à la gélatinase des neutrophiles
- NK : Natural Killer
- NT pro BNP : Peptide Natriurétique N terminal Type B
- PBS : Tampon Phosphate Salin
- PGHS : Prostaglandine H Synthase
- SCC : Société Centrale Canine
- TNF α : Facteur de nécrose tumorale α
- TnT : Troponine T
- VTT : Vélo tout terrain

INTRODUCTION

Bien que les sports équestres et canins existent depuis de nombreuses années, la variété de disciplines et leur importance en termes de nombre d'adhérents et de participants en compétition a très fortement augmenté au cours de ces dernières années. La Fédération Française de Sport de Trainneau (FFST) a ainsi enregistrée un doublement de ses licenciés ces quatre dernières années pour la pratique des sports canins d'attelage, et les évènements autour du chien de traineau rencontrent un succès grandissant tant en loisir, que dans la pratique d'activités touristiques ou en compétition. De nombreux clubs canins, gérés par la Société Centrale Canine (SCC), sont présents en France pour pratiquer un sport canin mettant l'athlète canin au centre de l'activité, avec une grande variété de disciplines telles que l'agility, le cani-cross, le cani-VTT... Les sports équestres gérés au niveau du territoire français par la Fédération Française d'Equitation (FFE) et la Fédération Equestre Internationale (FEI) au niveau international connaissent le même engouement. L'effort demandé aux chiens et chevaux de sport de haut niveau est impressionnant tant pour le néophyte que pour les initiés. L'objectif des encadrants de ces disciplines est de permettre à ces performances de se réaliser dans un cadre de bien-être de l'animal, élément incluant des critères physiques et psychiques, et de prévention à maxima des accidents lors des manifestations et à l'entraînement. Ainsi, des contrôles vétérinaires sont organisés sur tous les grands évènements afin de veiller à la bonne santé physique des animaux athlètes. Malgré cela, des accidents sont parfois à déplorer, incluant de manière rare mais notable le décès d'un chien ou d'un cheval. Ainsi, la nécessité de contrôles vétérinaires les plus précis possible en course est une évidence ; le recours aux examens complémentaires peut être justifié pour préciser les résultats de l'examen clinique.

A ce jour, plusieurs marqueurs de l'inflammation sont utilisés dans les différentes espèces. Cependant, la nécessité d'une prise de sang rend les analyses difficilement réalisables dans un contexte sportif en particulier sur le terrain et en compétition. Ainsi, le développement d'une méthode de dépistage de l'inflammation par un test non invasif et facile à réaliser serait utile dans le monde des sports canins et équins afin d'aider le vétérinaire lors des contrôles terrains.

La myéloperoxydase, découverte par Agner en 1941 (Agner, 1941) est une enzyme hémique à activité peroxydase, présente dans les granules azurophiles des neutrophiles. Elle est libérée lors de processus inflammatoire dans le milieu extra cellulaire ainsi que dans les liquides biologiques (urines, salive). Elle s'est avérée au cours des études successives, lorsqu'elle est mesurée dans le sang, être un marqueur de l'inflammation.

L'objectif de ce travail est de faire d'une part le point sur les mécanismes de l'inflammation et le rôle de la myéloperoxydase dans celle-ci, et d'autre part, d'évaluer la répétabilité et la reproductibilité d'un test salivaire permettant de déterminer de manière qualitative la quantité de MPO présente dans la salive d'animaux sains au repos, chiens et chevaux.

La première partie de notre travail est une étude bibliographique présentant une synthèse des informations disponible sur le mécanisme de l'inflammation, et plus particulièrement la myéloperoxydase. La seconde partie présente les résultats de notre étude expérimentale qui a consisté à participer au développement d'une méthode fiable de dépistage de la MPO salivaire chez le chien et le cheval.

1. PREMIERE PARTIE : ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Les neutrophiles et leurs implications dans la réaction inflammatoire

1.1.1. Rappels sur la réaction inflammatoire

1.1.1.1. Définition

Au cours du temps, la notion d'inflammation a fortement évolué. D'après Scott (2004), elle a été découverte par Celsus il y a 2000 ans. Celui-ci lui attribuait alors quatre signes : chaleur, rougeur, gonflement et douleur. Le terme d'impotence fonctionnelle a été rajouté à la définition par R. Virchow en 1858. Aujourd'hui, on définit l'inflammation ou réaction inflammatoire comme étant la réponse des tissus vivants vascularisés à une agression (Abbas *et al.*, 2015). Ce processus comprend des phénomènes généraux d'une part, exprimés biologiquement pas le syndrome inflammatoire et cliniquement de façon variable (fièvre, altération de l'état général), et des phénomènes locaux dans le tissu conjonctif vascularisé d'autre part. Ainsi, les tissus non vascularisés (cartilage par exemple) sont incapables de développer une réaction inflammatoire complète. L'inflammation est normalement un phénomène bénéfique dont le but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Cependant elle peut parfois être néfaste en particulier en cas d'anomalie de régulation du processus inflammatoire (CLOS, 2012).

1.1.1.2. Etiologie

L'inflammation est le plus souvent due à un agent pathogène responsable de lésions cellulaires et tissulaires qui déclenchent l'inflammation. Il peut s'agir d'une infection (bactéries, virus, parasites, champignons), d'un agent physique (traumatisme, chaleur, froid...), d'un agent chimique (caustique, toxines), d'un corps étranger exogène ou endogène, d'un défaut de vascularisation à l'origine d'une nécrose par ischémie ou bien d'une agression dysimmunitaire (CLOS, 2012). L'effort physique induisant à la fois une répétition de micro-traumatismes, et de phénomènes d'ischémie-reperfusion est donc un phénomène potentiellement hautement inflammatoire.

1.1.1.3. Déroulement général des différentes étapes de la réaction inflammatoire

Nous reprendrons les différentes étapes de la réaction inflammatoire décrites par CLOS (2012).

1.1.1.3.1. Réaction vasculo-exsudative

Cette phase débute par une étape de congestion active, qui se caractérise par une vasodilatation artériolaire puis capillaire de la zone atteinte. Ceci entraîne une augmentation de l'apport sanguin associée à un ralentissement du courant circulatoire.

Ensuite, un exsudat constitué d'eau et de protéines plasmatiques passe dans le tissu conjonctif interstitiel ou les cavités séreuses et constitue un œdème inflammatoire. Ceci entraîne un gonflement des tissus mous responsable de la douleur. Il permet l'apport de médiateurs chimiques de l'inflammation et de moyens de défense, et favorise le phénomène de diapédèse leucocytaire, première étape de la phase cellulaire.

1.1.1.3.2. Réaction cellulaire

La réaction cellulaire commence par la phase de diapédèse leucocytaire correspondant au passage de leucocytes à travers les parois des capillaires dilatés et à leur accumulation dans le foyer lésionnel. Les premières cellules à traverser sont les polynucléaires, en particulier les neutrophiles pendant les 6 à 24 premières heures. Dans un second temps, ils sont suivis par les monocytes et les macrophages. En effet, les polynucléaires neutrophiles sont doués d'une grande mobilité et ils sont donc les premiers à arriver au niveau du foyer inflammatoire par diapédèse (c.f.1.1.3). Leur nombre décroît ensuite rapidement car leur durée de vie en dehors du compartiment sanguin est courte. On observe d'abord un ralentissement du courant circulatoire permettant une accumulation des leucocytes le long de l'endothélium vasculaire. Ceux-ci vont ensuite adhérer aux cellules endothéliales, permettant leur passage à travers la paroi vasculaire. Après avoir quitté la circulation, les leucocytes continuent à migrer vers le site inflammatoire par chimiotactisme.

Une fois sur le site inflammatoire, les neutrophiles phagocytent les débris cellulaires et les agents infectieux. Le polynucléaire ingère la particule en invaginant sa membrane

plasmique, avec formation corrélatrice d'un phagosome qui fusionne avec les lysosomes dont les enzymes dégradent la particule ingérée.

Les monocytes (macrophages et cellules dendritiques) vont ensuite stimuler les polynucléaires et devenir des cellules présentatrices d'antigènes permettant de passer au stade d'inflammation chronique spécifique qui ne sera pas détaillé ici.

1.1.1.3.3. Détersion

La détersion correspond à la phase où les éléments étrangers ou nécrosés sont éliminés du foyer inflammatoire. Elle peut être interne, lorsque les macrophages prennent en charge les déchets, ou externe lorsque ceux-ci sont éliminés vers l'extérieur, par la peau ou dans un conduit naturel. C'est le cas des abcès sous cutanés qui murissent sous la peau puis vont fistuliser, souvent vers l'extérieur, afin d'éliminer des éléments étrangers via le drainage du pus.

La détersion externe peut être indirecte si le foyer inflammatoire est situé à distance de la peau et qu'une fistule se forme afin de relier ce foyer inflammatoire à l'extérieur. Enfin, la détersion peut être chirurgicale, ce qui consiste à nettoyer le foyer infectieux afin de favoriser la guérison.

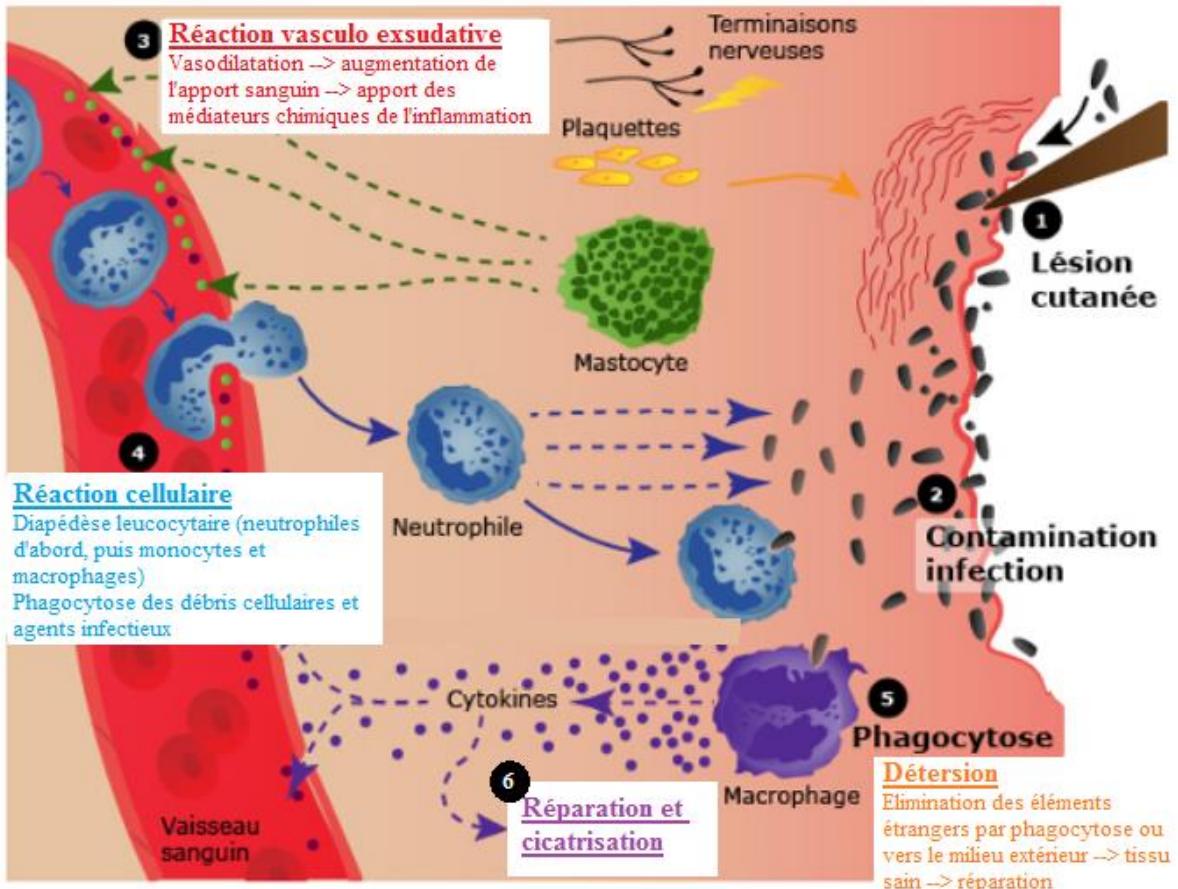
La détersion est une étape essentielle à la réparation qui ne peut se faire que sur un milieu sain.

1.1.1.3.4. Réparation et cicatrisation

Cette phase permet de faire disparaître toutes traces de la réaction inflammatoire. Dans un premier temps, on assiste à la mise en place d'une matrice extracellulaire riche en glycosaminoglycane et en fibronectine mais pauvre en collagène. Les macrophages activés par la phagocytose des polynucléaires apoptotiques jouent un rôle essentiel à cette étape puisqu'ils libèrent de nombreux facteurs permettant la mise en place de cette matrice. Celle-ci est ensuite stabilisée par le collagène qui s'organise en couches.

La Figure 1 reprend les étapes de l'inflammation.

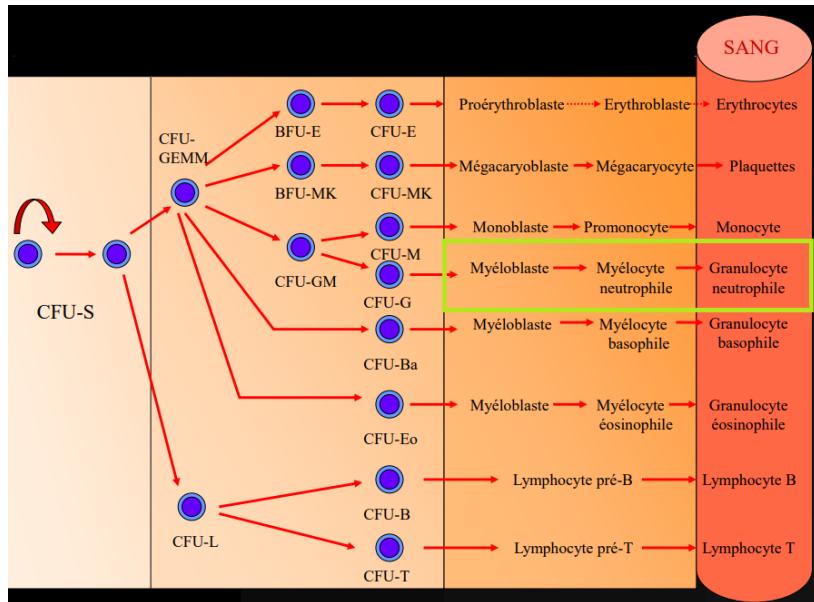
Figure 1 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'inflammation (Réalisation personnelle)



1.1.2. La formation des neutrophiles lors de l'hématopoïèse

Les cellules neutrophiles dont nous venons de parler sont formées lors de l'hématopoïèse. Ce processus correspond à la formation des cellules de la lignée sanguine. Il se déroule en continu dans l'organisme et durant toute la vie de l'animal. La cellule souche hématopoïétique pluripotente donne tous les précurseurs et les cellules différencierées de toutes les lignées. Après la naissance, la moelle osseuse est le principal site de déroulement de l'hématopoïèse. Comme le montre la Figure 2, les granulocytes neutrophiles sont issus des myéloblastes qui se différencient en myélocytes neutrophiles puis en granulocytes neutrophiles. L'ensemble des granulocytes (basophiles et éosinophiles également) est issu de myéloblastes.

Figure 2 : Déroulement de l'hématopoïèse, différenciation des neutrophiles (D'après Cordonnier, 2016).



CFU-GEMM = CFU-granulocyte érythrocyte monocyte megacaryocyte ; **BFU-E** = Burst Forming Unit de la lignée des érythrocytes ; **CFU-E** = lignée des érythrocytes ; **BFU-MK** = lignée des mégacaryocytes ; **CFU-MK** = lignée des mégacaryocytes ; **CFU-GM** = lignée des monocytes et des granulocytes neutrophiles ; **CFU-M** = lignée des monocytes ; **CFU-G** = lignée des granulocytes neutrophiles ; **CFU -Ba** = lignée des granulocytes basophiles ; **CFU -Eo** = lignée des granulocytes éosinophiles ; **CFU-L** = lignée lymphoïde ; **CFU-B** = lignée lymphoïde B ; **CFU-T** = lignée lymphoïde T

1.1.3. Les neutrophiles et leur migration jusqu'au site inflammatoire

Après leur différenciation dans la moelle osseuse, les neutrophiles entrent dans la circulation sanguine et circulent dans l'ensemble du corps (Abbas *et al.*, 2015). Bien que ces cellules soient capables de phagocytter et de détruire des agents pathogènes dans le sang, leur action principale se fait dans le milieu extravasculaire. Les neutrophiles de la circulation sanguine sont recrutés par les tissus infectés. Les macrophages ayant phagocyté des microbes produisent des cytokines (TNF α , IL-1 β) qui activent les cellules endothéliales qui produisent alors la sélectine, des récepteurs aux intégrines et des chémokines.

Les sélectines permettent une fixation de faible affinité des neutrophiles sanguins sur les cellules endothéliales et la force du flux sanguin permet le « roulement » des neutrophiles à la surface des cellules endothéliales.

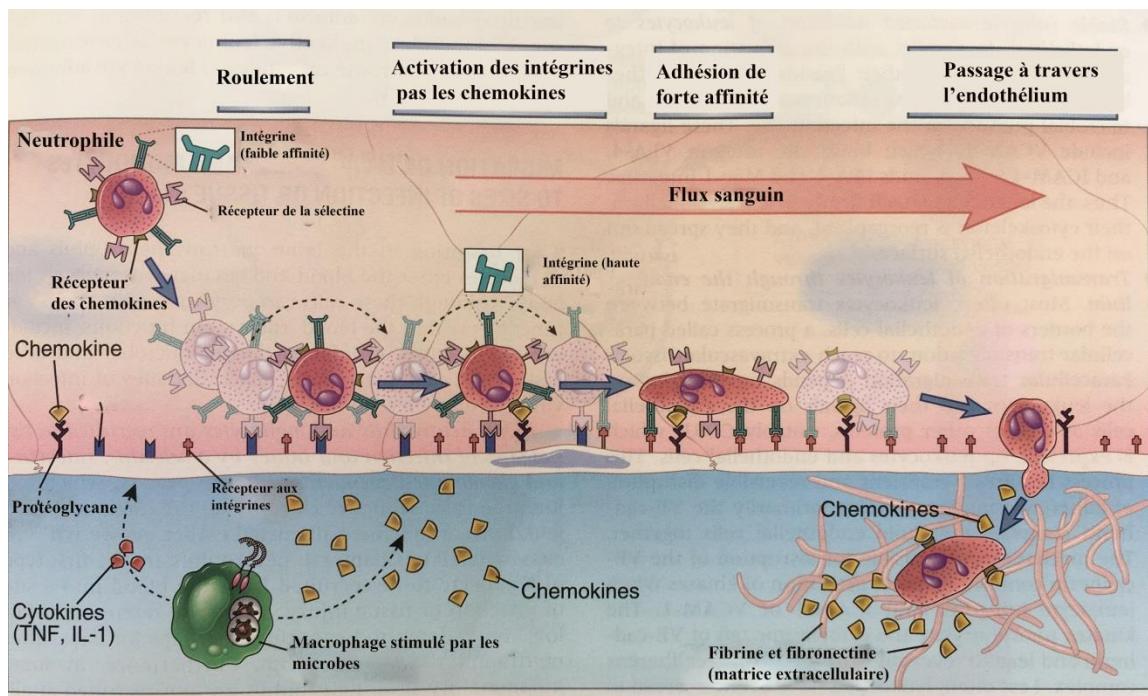
Les chémokines produites dans le tissu infecté ou par les cellules endothéliales sont disséminées à la surface des cellules endothéliales et se lient aux récepteurs présents à la

surface des neutrophiles. Ceci entraîne une activation des intégrines des neutrophiles qui passent alors à un haut niveau d'affinité. Les intégrines activées se lient ensuite aux cellules endothéliales ce qui permet une fixation de haute affinité entre les neutrophiles et les cellules endothéliales.

Les neutrophiles se déplacent ensuite vers les jonctions cellulaires où ils peuvent traverser la paroi vasculaire et atteindre le tissu lésé.

L'ensemble de ces étapes est repris dans la Figure 3.

Figure 3 : Migration des neutrophiles jusqu'au site inflammatoire (D'après Abbas *et al.*, 2015)



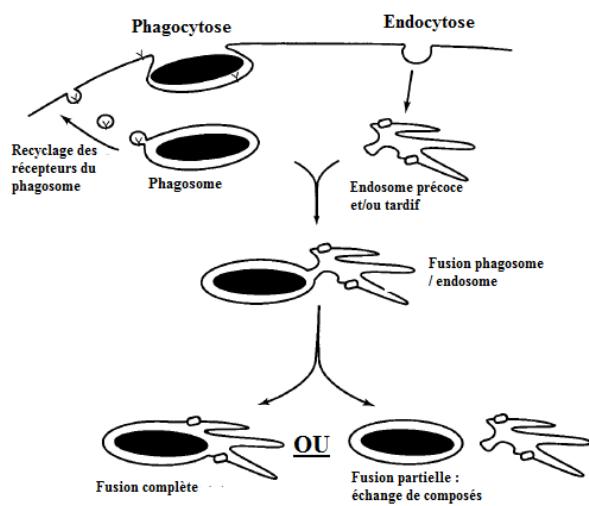
1.1.4. Le rôle de phagocytose des neutrophiles

Les neutrophiles sont des cellules spécialisées dans la phagocytose chez l'humain. Ils phagocytent les bactéries dans des organites cellulaires appelés des phagosomes et contenant de nombreux agents cytotoxiques.

1.1.4.1. La formation du phagosome

Le neutrophile établit d'abord un contact étroit avec l'organisme à phagocytter, puis la membrane plasmique du neutrophile l'entoure progressivement jusqu'à ce qu'il soit totalement encerclé, ce qui conduit à la formation du phagosome. Ceci permet de minimiser la quantité de liquide extracellulaire présent dans le phagosome. De nombreux granules fusionnent alors avec le phagosome pour y déverser leur contenu et représentent une part importante de son volume. Le contenu des granules est libéré en quelques secondes après la phagocytose (Edwards *et al.*, 1987; Hirsch et Cohn, 1960). La fusion avec des vésicules de la cellule (préférentiellement des organites de la voie endocytaire) permet la formation de phagolysosomes. Les endosomes (ou granules) précoces et tardifs fusionnent facilement avec les phagosomes de manière ATP dépendante. Ainsi, au fur et à mesure des fusions successives, la membrane du phagosome change progressivement pour devenir semblable à celle des endosomes plus tardifs. L'efficacité de cette fusion des endosomes avec le phagosome diminue à mesure que les phagosomes vieillissent. Ceci explique que les phagosomes acquièrent les enzymes lysosomales très tôt après leur formation (environ deux heures). La Figure 4 présente la fusion du phagosome avec les endosomes. Lors de la fusion, les deux organites peuvent s'échanger leurs composants internes et membranaires. La fusion peut être totale ou partielle. Plusieurs fusions, totales et partielles, permettent d'aboutir à la formation du phagosome mature. (Tjelle *et al.*, 2000).

Figure 4 : Modèle de fusion du phagosome avec les endosomes (Tjelle *et al.*, 2000).



1.1.4.2. La production d'oxydants dans le phagosome

Pendant la phagocytose, les neutrophiles consomment une quantité d'oxygène similaire à celle des stimuli fortement solubles, mais ne libèrent que de petites quantités d'anion superoxyde ou de peroxyde d'hydrogène dans l'environnement. L'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont générés dans le phagosome et autour des bactéries ingérées. En présence d'inhibiteurs de la myéloperoxydase, le peroxyde d'hydrogène détecté dans le milieu peut représenter la majeure partie de l'oxygène consommé. En supposant que l'ingestion de 15 à 20 bactéries donne une consommation maximale d'oxygène, Hampton et al. ont calculé que l'anion superoxyde devrait se former dans le phagosome à un taux extraordinairement élevé de 5 à 10 mmol/L par seconde. Etant donné le nombre de granules dans le phagosome, la concentration en myéloperoxydase devrait tourner autour de 1 à 2 mmol/L. Ainsi une forte production de HOCl dans le phagosome est attendue. Cependant, l'activité enzymatique de la myéloperoxydase est très complexe et la production de HOCl dépend fortement des conditions. Par exemple, sa production est diminuée à pH acide ainsi qu'en cas de fortes concentrations en peroxyde d'hydrogène ou en chlorides (Hampton *et al.*, 1998).

1.1.5. L'activation des neutrophiles et leur impact sur le site inflammatoire

La stimulation des neutrophiles ainsi que la phagocytose de micro-organismes par ceux-ci induit une soudaine augmentation exponentielle de leur consommation en oxygène. C'est ce qu'on appelle « la flambée respiratoire », causée par un complexe NADPH oxydase présent au niveau de la membrane du phagosome. Celle-ci conduit à la formation d'espèces réactives de l'oxygène, et de l'azote que nous ne détaillerons pas ici. En effet, les neutrophiles sont une source majeure d'oxydants très réactifs et contribuent de manière certaine aux dommages cellulaires et tissulaires liés à l'oxydation dans les différentes pathologies où les cellules inflammatoires interviennent.

La stimulation des neutrophiles conduit également à leur dégranulation et à la diffusion d'enzymes hydrolytiques et protéolytiques (cf. 1.1.6.2).

Ces espèces réactives de l'oxygène et ces enzymes agissent normalement à l'intérieur du phagosome pour la destruction des organismes phagocytés mais elles peuvent parfois être relâchées dans le milieu extracellulaire et contribuer à la destruction des cellules et des tissus voisins (cf. 1.2.5.3) lorsque la stimulation des neutrophiles est excessive et devient incontrôlable.

Les neutrophiles deviennent apoptotiques après la phagocytose, et les espèces oxydantes sont impliquées dans ce processus. Ce dernier implique le peroxyde d'hydrogène et ses dérivés, mais les espèces oxydantes issues de l'action de la myéloperoxydase ne semblent pas impliquées (Hampton *et al.*, 1998).

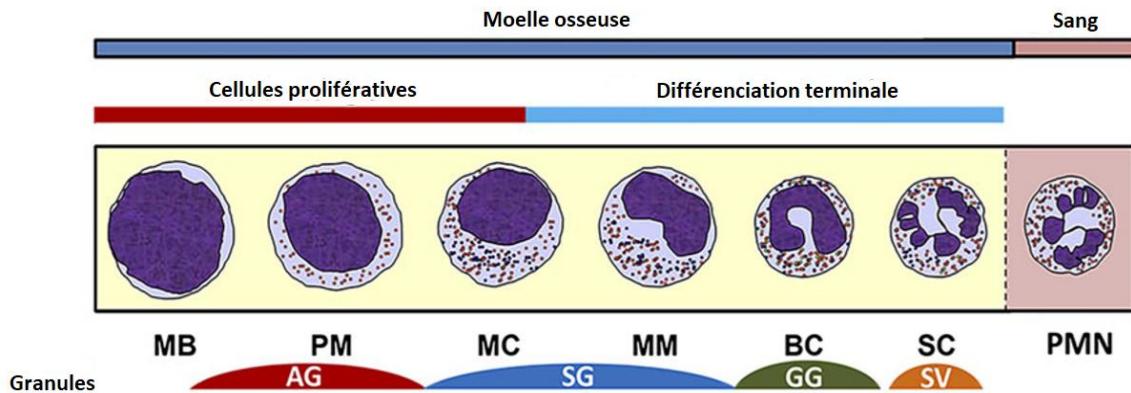
1.1.6. Les granules des neutrophiles

1.1.6.1. Présentation

D'un point de vue historique, les granules des neutrophiles étaient séparés en deux groupes sur la base de la coloration à la myéloperoxydase. On distinguait les granules azurophiles et les granules spécifiques ou secondaires. Cependant, on a découvert par la suite que le contenu des granules s'adaptait progressivement et sélectivement aux changements d'environnement. Les granules azurophiles sont synthétisés essentiellement au stade promyélocyte et contiennent la myéloperoxydase (molécule d'adhésion de la matrice). Les granules secondaires sont eux synthétisés dans les myélocytes (CLOS, 2012).

La granulopoïèse débute lorsque les myéloblastes se différencient en promyélocytes (Figure 5). Des études sur les neutrophiles de lapin ont montré la présence de trois types de granules dans le neutrophile mature. Leur formation séquentielle dans la moelle osseuse a permis de les nommer granules primaires, secondaires et tertiaires (Bainton *et al.*, 1971). Des études plus approfondies sur les neutrophiles humains ont ensuite permis de préciser tout cela en caractérisant les granules primaires de granules azurophiles, les granules secondaires de granules spécifiques et les granules tertiaires de granules à gélatinase (Cowland et Borregaard, 2016).

Figure 5 : Etapes de la granulopoïèse (D'après Cowland et Borregaard, 2016).



MB = Myéloblaste ; PM = promyélocyte ; MC = Myélocyte ; MM = métamyélocyte ; BC = ; SC neutrophile segmenté ; PMN = granulocyte neutrophile ; AG = granule azurophile ; SG = granulocyte spécifique ; GG = granule à gélatinase ; SV = vésicules sécrétaires. (D'après Cowland et Borregaard, 2016)

- Les granules azurophiles (Bainton et Farquhar, 1968)

La myéloperoxydase est la protéine qui définit les granules positifs à la peroxydase, communément appelés granules azurophiles. Les autres protéines majeures des granules azurophiles sont les sérine-protéases, la protéinase 3, la cathepsine G, l'élastase neutrophile, la protéase enzymatique inactive CAP37 (azurocidine) et la protéine NSP4. On trouve également dans ces granules les défensines et la protéine bactéricide augmentant la perméabilité. A ce jour, la question de savoir si les neutrophiles contiennent des lysosomes en tant qu'entité distincte ou si les granules azurophiles doivent être considérés comme les lysosomes des neutrophiles n'est pas complètement tranchée.

- Les granules spécifiques et les granules à gélatinase

Les granules négatifs à la peroxydase contiennent d'autres protéines dont la lactoferrine, la lipocaline associée à la gélatinase des neutrophiles (NGAL) et la gélatinase. Ils peuvent être séparés en trois sous populations de granules : les granules contenant de la lactoferrine et du NGAL mais pas de gélatinase, des granules contenant de la gélatinase mais pas de lactoferrine ou de NGAL et des granules contenant les trois (Kjeldsen *et al.*, 1993).

1.1.6.2. La dégranulation des neutrophiles : libération de la myéloperoxydase

La myéloperoxydase (MPO) est une enzyme spécifique des granules azurophiles des neutrophiles (King *et al.*, 1997). Les granules des neutrophiles semblent également contenir un certain nombre de protéinases potentiellement capables d'activer ou d'inactiver les enzymes libérées et donc de réguler leur activité extracellulaire (Edwards *et al.*, 1987). Ainsi, l'inactivation de la myéloperoxydase dans le milieu extracellulaire pourrait être due à l'action d'une de ces protéinases. L'inactivation rapide de la MPO après sa libération pourrait également être due à la formation d'un complexe MPO-H₂O₂.

1.2. Structure et rôles de la myéloperoxydase

1.2.1. Histoire

La myéloperoxydase fut mentionnée pour la première fois par Agner sous le nom de verdoperoxydase en 1941 (Agner, 1941).

Elle a été purifiée depuis chez l'homme, le bovin, le porc, le chien, les rongeurs et le cheval. Elle appartient à la famille des peroxydases des mammifères qui comprend : la lactoperoxydase, l'éosinophile peroxydase, la peroxydase thyroïdienne, la prostaglandine H-synthase (PGHS) et la myéloperoxydase.

1.2.2. Structure et synthèse

La conformation de la MPO est très semblable dans les différentes espèces mais quelques séquences d'acides aminées varient d'une espèce à l'autre. La myéloperoxydase humaine est celle qui a été de loin la plus étudiée.

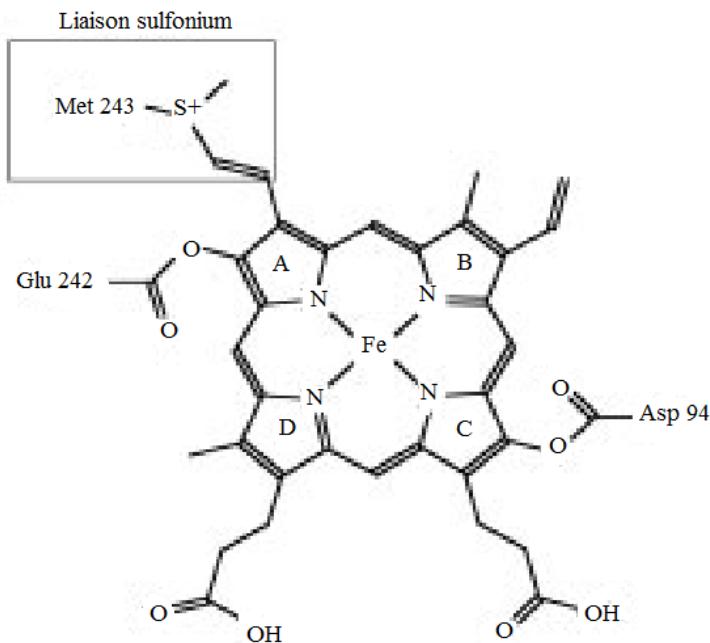
1.2.2.1. MPO humaine

1.2.2.1.1. Structure de la myéloperoxydase

Elle a été décrite pour la première fois par Agner en 1941. En 2003, Serteyn *et al.* décrivent sa structure de manière plus précise. La myéloperoxydase est une enzyme hémique (Figure 6). Elle possède en effet un hème, dérivé de la proporphyrine IX, lié par son atome de fer Fe^(III) à deux histidines de la protéine. L'ensemble forme un complexe hexacoordonné sur l'atome de fer Fe^(III).

L'hème présente également au niveau de deux noyaux pyrroles trois liaisons covalentes avec des acides aminés de la protéine : deux groupes méthyles modifiés sont liés respectivement à un résidu aspartate et à un résidu glutamate. Ces deux liaisons sont communes à toutes les peroxydases des mammifères. La troisième liaison se forme entre le groupe vinyle d'un noyau pyrrole et l'atome de souffre de la méthionine. Cette liaison sulfonium est caractéristique de la myéloperoxydase et responsable des activités de chloration.

Figure 6 : Structure du noyau hémique de la MPO humaine (D'après Serteyn *et al.*, 2003)



La myéloperoxydase mature humaine est un homodimère symétrique formé de deux hémi enzymes elles-mêmes composées de deux sous unités reliées par un pont disulfure. Une chaîne lourde allant de 55 kDa à 80 kDa et une chaîne légère allant de 10 à 15 kDa composent chaque sous unité (Koeffler *et al.*, 1985). Son site actif est localisé à la base d'une poche hydrophobe, étroite et profonde, accessible uniquement pour les substrats de faible poids moléculaire.

1.2.2.1.2. Synthèse de la myéloperoxydase

La synthèse de la MPO a été décrite par plusieurs auteurs (Hansson *et al.*, 2006; Koeffler *et al.*, 1985).

- Forme précurseur de l'enzyme : protéine de 70 à 80 kDa, modifiée dans le réticulum endoplasmique par N-glycosylation pour donner une apopro MPO de 90 kDa inactive ;
- L'apopro MPO incorpore le groupe prosthétique hémique Fe^{3+} dans le réticulum endoplasmique pour donner la pro MPO de 90 kDa ;
- La pro MPO quitte le réticulum endoplasmique et passe dans un compartiment pré-granulaire où elle devient l'enzyme mature.

Plusieurs études montrent la présence de MPO et de son ARN messager uniquement aux premiers stades de différenciation myéloïde avec un pic au stade promyélocyte. Le gène devient indétectable dans les granulocytes matures. Ainsi, il a été déduit que la synthèse de la MPO se faisait uniquement au stade promyélocyte, la MPO n'est plus synthétisée au stade de granulocyte ou de macrophage même si ces cellules contiennent de l'enzyme active.

La régulation de la synthèse se fait essentiellement au stade d'ARNm.

1.2.2.2. MPO équine

La myéloperoxydase équine est semblable à la myéloperoxydase humaine. Il s'agit d'une enzyme glycosylée, composée de deux hémi enzymes contenant chacune une sous unité lourde contenant l'hème et une sous unité légère.

Ses caractéristiques et les modalités de son activité enzymatique semblent similaires à celles de la MPO humaine (Serteyn *et al.*, 2003).

1.2.3. Lieu de stockage

La myéloperoxydase est présente à concentration élevée (2 à 5 % en poids) dans les granules primaires des cellules polynucléaires neutrophiles. Il s'agit d'une enzyme spécifique des granules azurophiles primaires des neutrophiles (cf. 1.1.6)

On la retrouve également dans les monocytes en concentration plus faible. La concentration en MPO devient indétectable lors de la maturation en macrophages (Serteyn *et al.*, 2003).

La concentration en MPO est trois fois plus importante dans les neutrophiles que dans les monocytes. De plus, elle représente plus de 5% des protéines totales contenues dans les neutrophiles.

On la retrouve ainsi dans les fluides biologiques dans lesquels on peut retrouver ces cellules. Son activité peut donc être retrouvée dans le sang d'une part, ainsi que dans la salive, les urines, les larmes ou encore le tissu musculaire (cf. 1.3.2)

1.2.4. Activité enzymatique et régulation

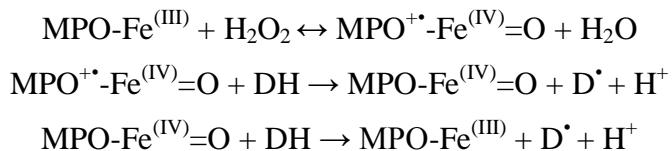
1.2.4.1. Activité enzymatique

La myéloperoxydase possède deux activités enzymatiques majeures : l'activité peroxydase (Klebanoff, 2005) et l'activité de chloration (Harrison et Schultz, 1976). Ces deux activités sont possibles sous forme proMPO et sous forme mature.

La forme naturelle MPO-Fe^(III) et son composé I CdI (structure hémique à Fe^(IV) avec un radical centré sur un acide aminé de la protéine) possèdent une très grande réactivité.

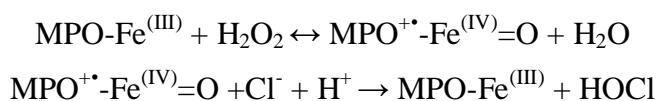
1.2.4.1.1. L'activité peroxydase

Les peroxydases sont des enzymes utilisant le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ pour oxyder leur substrat. Le composé I MPO⁺-Fe^{(IV)=O} (noté CdI par la suite) peut ainsi réagir avec plusieurs substrats réducteurs (DH) comme l'ascorbate, l'urate, les catécholamines, la sérotonine, les œstrogènes, la tyrosine ou l'ion nitrite NO₂⁻ pour former une espèce oxydante notée D[•] ainsi que le composé II (noté CdII) MPO-Fe^{(IV)=O}. L'oxydation d'une nouvelle molécule DH permet alors le retour à la forme native MPO-Fe^(III) ainsi que la formation d'une seconde espèce oxydante. Les réactions chimiques de l'activité peroxydase sont regroupées ci-dessous (Serteyn *et al.*, 2003) :



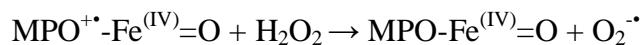
1.2.4.1.2. L'activité de chloration

La myéloperoxydase, grâce au peroxyde d'hydrogène, catalyse l'oxydation à deux électrons des ions Cl⁻ pour former l'acide hypochloreux HOCl, lui-même étant une espèce oxydante puissante. Cette réaction passe également par la formation du composé I présenté ci-dessus. Le composé I CdI réagit rapidement avec les ions chlorures (Cl⁻) pour former l'acide hypochloreux (HOCl) et restituer MPO-Fe^(III). La formation de HOCl se fait donc par les réactions suivantes (Serteyn *et al.*, 2003) :



1.2.4.1.3. Réactions annexes

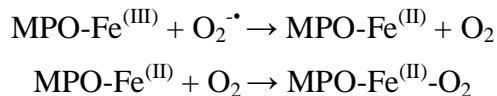
Deux réactions annexes considérées comme indésirables peuvent avoir lieu (Serteyn *et al.*, 2003). D'une part, le composé I peut réagir lui-même avec le peroxyde d'hydrogène pour former l'anion superoxyde $O_2^{-\bullet}$ et le composé II selon la réaction suivante :



D'autre part, la forme native peut réagir directement avec l'acide hypochloreux pour former le composé I CdI :



La MPO-Fe^(III) peut également former le composé III – Cd III - MPO-Fe^(II) inactif sous l'action de réducteurs comme l'ion superoxyde $O_2^{-\bullet}$ selon la réaction suivante :



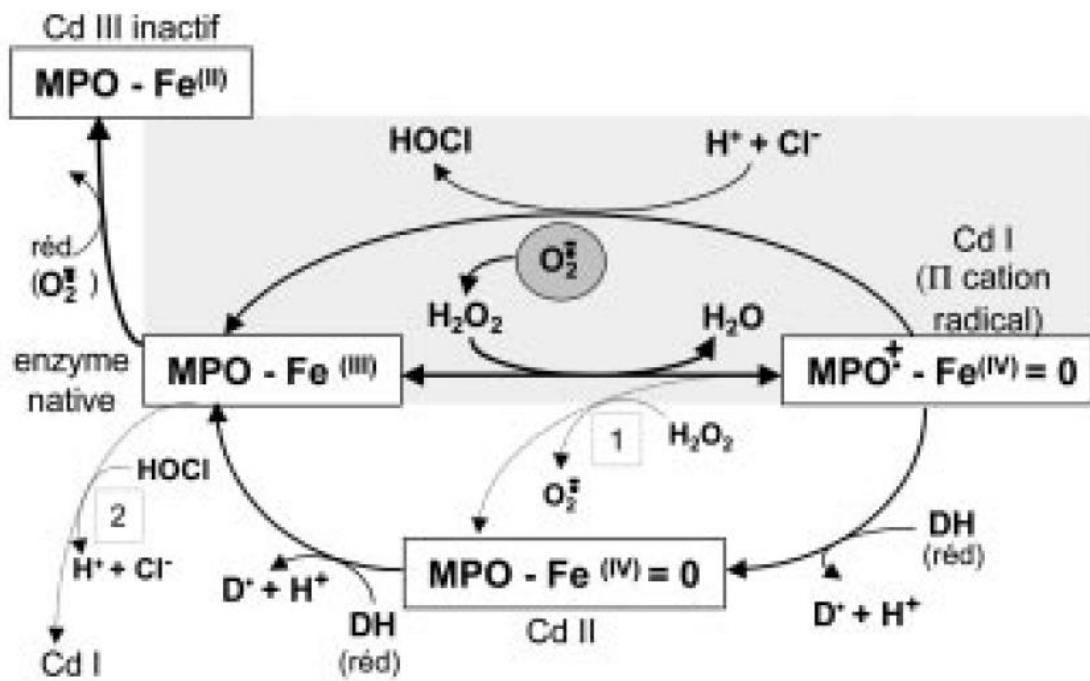
Cette inactivation pourrait se produire au début de la phagocytose lorsque le pH du phagosome est alcalin ou neutre, permettant un fonctionnement maximal de la NADPH oxydase et une quiescence de la myéloperoxydase.

1.2.4.1.4. Bilan sur les réactions enzymatiques catalysées par la myéloperoxydase

L'activité de chloration et l'activité peroxydase sont indissociables car elles sont à l'origine de composés intermédiaires communs.

L'ensemble des réactions contrôlées par la myéloperoxydase est schématisé dans la Figure 7.

Figure 7 : Etapes détaillées de l'activité enzymatique de la MPO (Serteyn *et al.*, 2003).



[MPO-Fe(III)] : enzyme native – Cd I : composé portant un radical libre sur un acide aminé de la chaîne protéique – DH : substrat donneur d'électrons (réduite : forme réduite) – Do : radical dérivé de DH par perte de Ho – 1 et 2 : voies réactionnelles annexes.

1.2.4.2. Espèces oxydantes produites par la myéloperoxydase

Toutes les MPO isolées à ce jour à partir de neutrophiles de différentes espèces produisent les mêmes familles d'oxydants. Le principal oxydant formé par action de la MPO est l'acide hypochloreux HOCl. Il s'agit d'un oxydant fort, capable d'oxyder et de chlorer de nombreuses molécules. Ainsi, il peut oxyder de nombreux substrats dont les fonctions thiols et thioesters de nombreuses protéines avec lesquelles il réagit très rapidement, mais également l'ascorbat, l'urate, la pyridine et le tryptophane avec lesquels la réaction est moins rapide. L'activité de chloration est possible avec les groupes amines pour donner des chloramines (espèces très oxydantes), les résidus tyrosyles, les lipides insaturés et le cholestérol pour donner des chlorhydrines et les cytosines des acides nucléiques. L'acide hypochloreux contribue à l'immunité contre les bactéries et les champignons (bactéricide puissant). De plus, il s'agit d'un composé directement cytotoxique à forte concentration. En faible concentration, HOCl peut activer la voie MAPK et entraîner l'arrêt de la croissance cellulaire et l'apoptose (Rutgers *et al.*, 2003; Serteyn *et al.*, 2003). La myéloperoxydase est

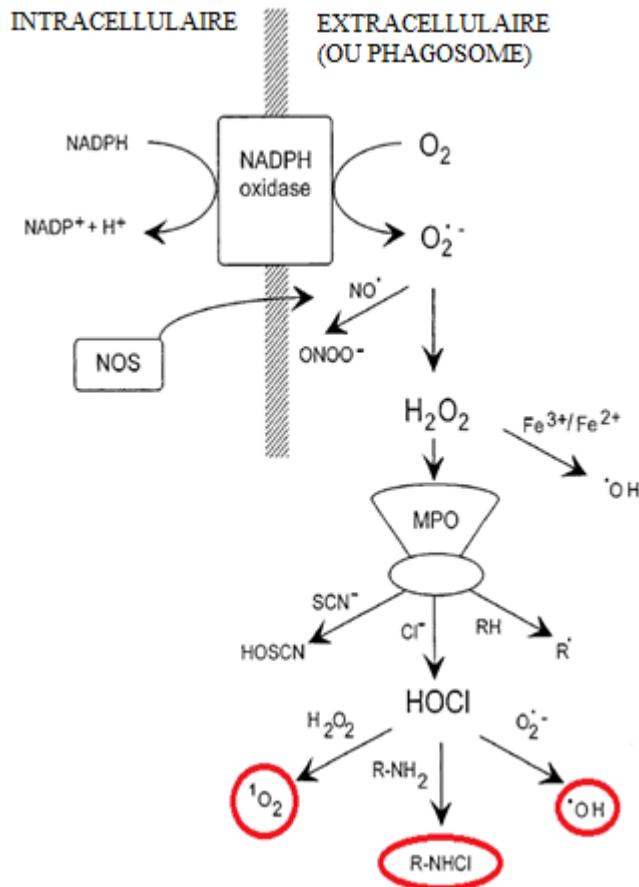
la seule enzyme humaine capable de catalyser la formation de HOCl dans des conditions physiologiques (Kettle et Winterbourn, 1997). Tous ces dérivés issus de la réduction de l'acide hypochloreux sont eux-mêmes pour la plupart des composés oxydants. Ainsi, la MPO est responsable de la synthèse directe ou indirecte de nombreuses espèces oxydantes qui participent à la défense de l'hôte.

La myéloperoxydase permet également la formation d'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ par réaction de H_2O_2 avec HOCl. L'oxygène singulet est très énergétique et capable d'oxyder la majorité des substrats organiques, mais son action *in vivo* est encore très discutée (Klebanoff, 2005; Serteyn *et al.*, 2003). Il serait capable de réagir avec de nombreuses molécules biologiques, dont les lipides membranaires, afin d'initier des réactions de peroxydation (Hampton *et al.*, 1998).

Les chloramines R-NHCl sont également des espèces réactives de l'oxygène issues de l'action de la myéloperoxydase sur HOCl et les amines R-NH₂. Les chloramines sont des oxydants moins puissants que HOCl et leur durée de vie est plus longue. Elles peuvent réagir avec les thiols, les thioesters, et les molécules possédant un hème avec un atome de fer. Leur toxicité est variable et dépend de la polarité et de la perméabilité membranaire. De plus, les chloramines issues des acides aminés α se dégradent lentement en aldéhydes potentiellement toxiques. Les chloramines ont également une activité bactéricide.

Enfin, par réaction entre HOCl et l'anion superoxyde O_2^- la myéloperoxydase est à l'origine de la formation du radical hydroxyle $^{\bullet}\text{OH}$. Celui-ci est extrêmement réactif avec la plupart des substrats biologiques. Il peut entraîner des modifications de l'ADN ou encore la séparation des brins d'ADN. De plus, il peut être à l'origine d'inactivation enzymatique ou encore de la peroxydation lipidique. Enfin, il peut générer des radicaux secondaires par exemple à partir du bicarbonate ou de chlorure (Hampton *et al.*, 1998). La Figure 8 (Hampton *et al.*, 1998) présente les différentes espèces réactives issues de l'action de la myéloperoxydase dans les neutrophiles ainsi que leur origine.

Figure 8 : Réactions oxydantes possibles suite à la stimulation des neutrophiles
 NOS : Oxide nitric synthase - MPO : myéloperoxydase. (D'après Hampton et al., 1998)



1.2.4.3. Régulation

En 1981, Segal *et al.* expliquent que la MPO est active à un pH optimal de 5,5. Dans le phagosome en début de phagocytose, le pH étant alcalin ou neutre, la MPO est alors sous forme inactive CdIII en majorité. A ce pH, le système NADPH oxydase est lui très actif ce qui permet la formation de peroxyde d'hydrogène qui servira ensuite à la MPO lorsque celle-ci sera active. La MPO devient active lorsque le pH du phagosome diminue, à la fin de la phagocytose.

Il semblerait que l'acide hypochloreux HOCl soit capable de détruire l'hème de la myéloperoxydase et ainsi d'entrainer son inactivation irréversible. Cette réaction contribuerait donc à un mécanisme d'autorégulation.

Plusieurs paramètres participent à la régulation des voies réactionnelles de la MPO : le pH, la production de O₂^{•-} conduisant à la formation d'H₂O₂, la concentration en Cl⁻, la concentration en réducteurs (ascorbate, méthionine) et en monoxyde d'azote NO en font partie. Le monoxyde d'azote est un radical libre libéré par l'oxyde nitrique synthase lors de

la modulation de l'activité peroxydase de la MPO. La MPO et l'oxyde nitrique synthase sont localisées dans les granules primaires des neutrophiles. Ainsi, lors de l'activation des phagocytes comme lors de l'ingestion d'une bactérie par exemple, ces deux protéines sont libérées ensemble dans le phagolysosome et dans le compartiment extracellulaire. D'après Abu-Soud et Hazen, (2000) à de faibles niveaux de NO, on observe une augmentation de l'activité peroxydase de la MPO, tandis qu'une inhibition de cette activité peroxydase est observée à des niveaux élevés de NO. Le monoxyde d'azote joue également un rôle de régulation en servant de substrat aux différents composés de la MPO.

1.2.5. Rôle dans l'organisme

1.2.5.1. Activité antimicrobienne

Le neutrophile phagocyte les microorganismes qui sont séquestrés et détruits dans les vacuoles phagocytaires (les phagosomes) par l'action oxydante des espèces activées dérivées de l'activité de la NADPH oxydase, de la NOsynthase et de la MPO et l'action des enzymes protéolytiques granulocytaires. La fusion des granules spécifiques avec les granules azurophiles contenant la MPO entraîne la formation de nouvelles espèces activées par l'action de la MPO dont l'action s'intensifie avec l'acidification du milieu. La MPO est active sur une grande variété de microorganismes qu'elle attaque par oxydation (virus, bactéries, champignons, protozoaires (Babior, 2000).

Les étapes de son activité antimicrobienne sont les suivantes :

- Fixation sur la membrane du microorganisme en de nombreux points où existent des structures polysaccharidiques ;
- Attaque extracellulaire des microorganismes trop volumineux pour être phagocytés ;
- Contact avec les microorganismes → production d'HOCl et autres espèces capables de chloration et de nitration qui attaquent plusieurs molécules : hèmes, groupes aminés, centre Fe-S, groupe SH, lipides insaturés et bases nucléiques... ;
- Oxydation des structures hémiques → altération de nombreuses fonctions enzymatiques dont celles de la chaîne respiratoire → mort bactérienne.

Odell et Segal, (1988) ont montré que l'effet bactéricide apparaissait au moment de la flambée respiratoire. De plus, cette étude portait sur l'activité bactéricide sur *S. aureus* et semble avoir démontré que l'activité intracellulaire du système MPO seul ne suffisait pas à détruire cette bactérie et que la participation d'autres composants des granules était également nécessaire.

De nombreuses espèces de bactéries sont facilement tuées par le système myéloperoxydase/hydrogène, peroxyde/chloride. Ces systèmes ciblent particulièrement les protéines contenant des atomes de soufre ou de fer, les protéines de transport, les systèmes de génération d'ATP ainsi que les sites de réPLICATION de l'ADN (Hampton *et al.*, 1998).

1.2.5.2. Activité sur le système inflammatoire

Bradley *et al.*, (1982) ont mesuré la teneur en MPO dans les neutrophiles circulants et dans les neutrophiles qui avaient migré sur des sites d'infection bactérienne *in vivo*. Il a été montré que le processus de phagocytose induit une perte de MPO des neutrophiles et qu'une fraction de l'enzyme perdue peut être retrouvée sous forme active dans le milieu extracellulaire. Ainsi, les neutrophiles libèrent de la MPO qui se retrouve dans le milieu extracellulaire. Au cours d'une réaction inflammatoire contrôlée, l'activité de la MPO se limite aux vacuoles intracellulaires et seules des petites quantités de MPO sont libérées dans le milieu extracellulaire (10 à 15%). Si la réaction inflammatoire devient incontrôlée, la dégranulation massive et la mort des neutrophiles entraînent un relargage important de MPO dans le milieu extracellulaire.

Ainsi, la MPO est prise comme marqueur dans de nombreuses affections liées à l'activation des neutrophiles et à leur infiltration tissulaire.

Au niveau des sites inflammatoires, la MPO est responsable de l'inactivation d'enzymes et de l'oxydation de nombreuses molécules comme les molécules hémiques, porphyrines, lipides insaturés, l'ADN, les nucléotides...

Une fois dans le milieu extérieur, la MPO va catalyser la formation de HOCl à partir d'ions chlorides et du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (Rutgers *et al.*, 2003). HOCl oxyde pratiquement tous les acides aminés en aldéhydes qui deviennent des composés actifs au site inflammatoire.

La MPO agit également en activant des enzymes latentes comme la progélatinase et la procollagénase ce qui conduit à la destruction de tissus conjonctifs. Là encore, cette activation est attribuée à l'action oxydante d'HOCl. Enfin, cela aboutit à une fragilisation du squelette protéique.

Certains auteurs commencent même à suggérer que des niveaux élevés de MPO *in vivo* pourraient être associés de manière universelle au développement d'une inflammation (Wang *et al.*, 2014).

1.2.5.3. Activité cytotoxique : un effet délétère pour l'organisme

La MPO est cytotoxique pour les hématies. Elle active la stimulation des plaquettes et peut oxyder les neutrophiles eux-mêmes. Elle est également cytotoxique pour les cellules endothéliales et les fibroblastes. En effet, *in vivo* les neutrophiles peuvent adhérer à l'endothélium et s'activer à son contact (Abbas *et al.*, 2015). On observe alors une dégranulation locale qui libère la MPO à l'origine d'une agression oxydante.

Lors de stimulation excessive des neutrophiles, la MPO contribue aux dommages cellulaires et tissulaires en produisant des espèces oxydantes telles que l'acide hypochloreux HOCl ou le chlorure (Cl-).

1.2.5.4. Agent modulateur des fonctions cellulaires

La MPO et HOCl activent le facteur nucléaire NF-kB qui peut augmenter l'expression des médiateurs de l'inflammation avec un effet bénéfique ou néfaste. Les espèces oxydantes dérivées de la MPO entraînent l'activation de la caspase-3, une protéase qui entraîne l'apoptose cellulaire lorsqu'elle est activée.

Les espèces oxydantes produites localement par la MPO lorsque celle-ci est libérée dans le milieu extracellulaire vont également influencer les fonctions des cellules avoisinantes. Ainsi, l'activité des lymphocytes « *natural killers* » est diminuée dans les tumeurs en présence de phagocytes. De plus, la MPO perturbe les fonctions de prolifération, de production d'anticorps et de cytolysse des lymphocytes B, T et NK. La MPO aurait donc dans ce cas un effet néfaste sur la lutte de l'organisme face aux cellules tumorales.

Par fixation sur les macrophages, la MPO peut également moduler d'une manière dose dépendante la production de certaines cytokines.

Enfin, la MPO agit sur les neutrophiles en diminuant leur activité phagocytose par modification oxydante des récepteurs cellulaires. Cet effet peut donc limiter la réaction inflammatoire (Stendahl *et al.*, 1984).

La MPO peut donc interagir avec de nombreuses cellules (lymphocytes, macrophages, fibroblastes, érythrocytes, plaquettes, cellules endothéliales) avec un effet qui peut être bénéfique ou néfaste. Elle peut aussi bien augmenter leurs défenses que les altérer selon l'intensité et les cibles atteintes par les espèces oxydantes produites.

Il semblerait enfin que la MPO joue un rôle dans l'apoptose des cellules transformées comme les cellules tumorales productrices d' $O_2\cdot$, mais ces données restent contestées (Engelmann *et al.*, 2000). Le tableau 1 récapitule les différents effets de la MPO et leurs conséquences pathologiques.

Tableau 1 : Effets de la myéloperoxydase et leurs conséquences pathologiques (D'après Rutgers *et al.*, 2003)

| Fonction | Effet | Importance pathologique |
|---|---|--|
| Production de HOCl | Bactéricide | Participe à l'élimination des bactéries |
| | Activation de pro-MMP | Contribution à la dégradation de la matrice |
| | Activation MAPK | Contribution à l'expression de MPO par les neutrophiles |
| | Inhibition de la prolifération des lymphocytes T Pro apoptotiques ou cytotoxiques selon la concentration | Apoptose excessive à l'origine d'auto-anticorps Apoptose des cellules endothéliales |
| Consommation de H₂O₂ | Inhibe l'inactivation des protéases | Contribution aux dommages vasculaires par les protéases |
| Inactivation des inhibiteurs de protéases | | |
| Oxydation | Oxydation des LDL | Pro apoptotique, stimulation des interactions entre cellules endothéliales et monocytes, stimulation de la prolifération des cellules musculaires lisses et des monocytes/macrophages, accumulation des LDL en son absence |
| Consommation de NO | Faible biodisponibilité en NO au site inflammatoire | Contribution au dysfonctionnement de l'endothélium, favorise les lésions rénales |

1.2.5.5. Déficience en MPO

Les patients atteints de déficience en MPO peuvent être séparés en deux types : la déficience en MPO primaire ou congénitale, et la déficience en MPO secondaire ou acquise. Dans les deux cas, la déficience en MPO peut être totale ou partielle. Les causes de déficience secondaire sont les suivantes :

- Néoplasie des cellules sanguines (leucémie myéloïde chronique, leucémie myéloïde aigue, myéofibrome avec métaplasie myéloïde) ;
- Cancers disséminés ;
- Carence en fer ;
- Intoxication au plomb ;
- Thrombopathie ;
- Transplantation rénale ;
- Maladies infectieuses sévères ;
- Diabète sucré ;
- Lipofuscinose ;
- Gestation.

La déficience en MPO secondaire peut être transitoire et un traitement étiologique permet souvent une résolution des effets enzymatiques.

Les caractéristiques biologiques et hématologiques des déficiences en MPO primaire et secondaire sont présentées dans le Tableau 2 (Lanza, 1998).

Tableau 2 : Comparaison des caractéristiques cliniques et biologiques des patients atteints de déficience en MPO primaire ou secondaire.

| Caractéristiques cliniques et biologiques | Déficience primaire | Déficience secondaire |
|---|---|----------------------------------|
| Héréditaire | Oui | Non |
| Activité en MPO dans les cellules sanguines | Absente (faible pour les déficiences partielles) | Variable d'une cellule à l'autre |
| Activité en MPO dans les précurseurs des cellules sanguines dans la moelle osseuse | Absente | Variable d'une cellule à l'autre |
| Variations intracellulaires de l'activité en MPO | Absentes (faible chez quelques patients ayant développé d'autres mutations du gène de la MPO) | Présentes dans tous les cas |
| Maladie concomitante | Parfois | Toujours |
| Type de mutation | Germinale | Somatique |
| Activité peroxydase dans les éosinophiles | Présente | Présente, parfois diminuée |

La déficience en MPO ne touche qu'une personne sur 4000, et il semble que ces personnes ne soient pas spécialement plus sensibles aux infections que les patients sains (Hampton *et al.*, 1998). Plusieurs études ont montré une diminution de l'activité fongicide, bactéricide et une augmentation des infections sévères à *Candida* chez les patients déficients en MPO qui souffraient aussi d'un diabète sucré. Il semble donc que l'association diabète sucré/déficience en MPO soit un facteur de risque d'infections sévères.

Enfin, la MPO semblant jouer un rôle dans l'apoptose de cellules tumorales, il a été évoqué à plusieurs reprises que les patients cancéreux souffrant de déficience en MPO auraient un risque plus élevé de développer une malignité. Ceci n'a cependant pas été démontré pour le moment (Kitahara *et al.*, 1981).

Les patients déficients en MPO ont de très haut taux d'enzyme anti oxydante des LDL (Swets *et al.*, 2001).

1.3. Milieu de dosage et intérêts cliniques du dosage de la MPO

1.3.1. Purification de la MPO : une étape préalable nécessaire aux différentes méthodes de dosage

Les leucocytes sont d'abord extraits du sang par sédimentation sur gradient de densité. Ensuite, les neutrophiles sont homogénéisés dans un tampon d'acétate de sodium à un pH de 4.7, puis des inhibiteurs de protéases sont ajoutés. Après centrifugation, les protéines des granulocytes dont la MPO sont pour la plupart rejetées dans le surnageant. La MPO est ensuite isolée par chromatographie. La purification de la MPO était ensuite vérifiée par électrophorèse et par des essais enzymatiques en comparaison aux MPO bovine et humaines déjà isolées par le passé et très proches de la MPO équine (Deby-Dupont *et al.*, 1998).

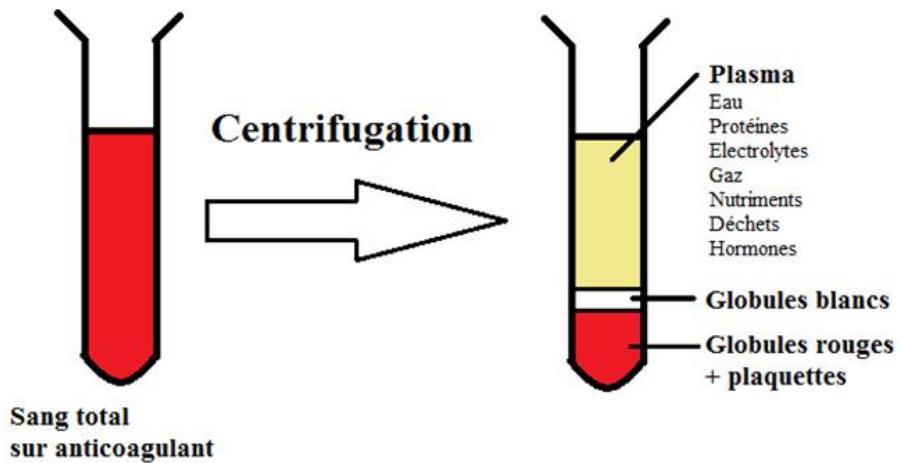
1.3.2. Méthodes et milieu de dosage

1.3.2.1. Plasma

1.3.2.1.1. Composition

Lorsque l'on centrifuge un échantillon de sang récolté sur un tube contenant un anticoagulant, on obtient trois phases : les globules rouges et les plaquettes, les globules blancs et le plasma (Akers et Denbow, 2013a). Ces trois phases sont présentées dans la Figure 9.

Figure 9 : Composition du sang après centrifugation (D'après Klein, 2013)



Le plasma correspond donc au liquide présent dans le sang et contenant en suspension et en solution des protéines (5 à 7%), des électrolytes, des nutriments, des gaz, des hormones et des déchets dans 91,5% d'eau (Gilles *et al.*, 2006a; Klein, 2013a).

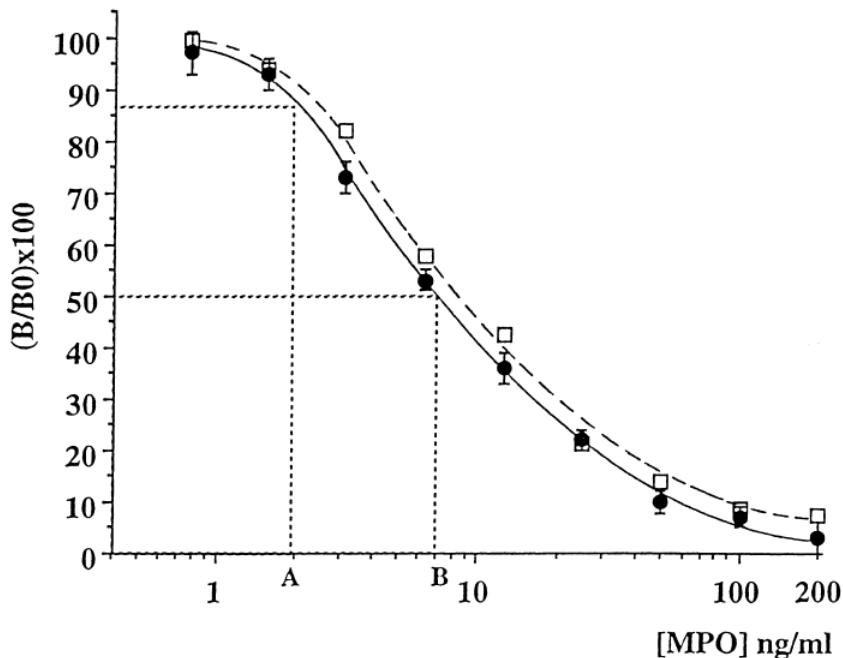
Les protéines majeures du plasma sont l'albumine (54% chez l'humain en moyenne), les globulines (environ 38%), le fibrinogène (environ 7%) et toute autre protéine pouvant être transportée par le sang dont la MPO (environ 1%). Les électrolytes contenus dans le plasma sont le sodium Na^+ , le chlore Cl^- , et les bicarbonates HCO_3^- . Les gaz sont en solution dans le plasma, ou bien couplés à des protéines de transport. On y trouve le dioxygène O_2 , le dioxyde de carbone CO_2 , et le diazote N_2 . Enfin, les nutriments correspondent à diverses molécules absorbées au niveau gastro-intestinal ou produits au niveau du foie tels que le glucose, les acides aminés ou encore les lipides (Akers et Denbow, 2013a).

1.3.2.1.2. Méthode de mesure de MPO

En 1998, Deby-Dupont et al mettent au point une méthode radio-immunologique de dosage de la MPO équine dans le plasma. L'activité de la MPO ne peut être mesurée dans le plasma car une grande partie de la MPO est sous forme inactive une fois sécrétée dans le milieu extérieur. Ainsi, afin de mettre en évidence l'activation des neutrophiles dans le sang des chevaux atteints de torsions intestinales, Deby-Dupont et al. ont d'abord purifié la MPO des neutrophiles pour ensuite développer une méthode radio-immunologique permettant de mesurer les variations de concentration en MPO dans le plasma.

Après purification (cf.1.3.1), la MPO est marquée à l'aide d'un marqueur radio actif, l'iode ^{125}I . Du sérum de lapin contenant des anticorps anti MPO équine a ensuite été mis en contact avec la MPO afin de créer des liaisons anticorps-anticorps. Puis, la radioactivité était mesurée pour des concentrations en MPO connue afin de réaliser une courbe étalon (Figure 10). Cette courbe est ensuite utilisée pour la mesure de concentrations de MPO non connues.

Figure 10 : Courbes standard de radio-immunologie pour la MPO équine obtenues à partir de MPO marquée depuis 4 jours (ronds) ou depuis 30 jours (carrés) (Deby-Dupont *et al.*, 1998).



Ordonnée : rapport (%) entre la quantité de traceur liée à l'anticorps en présence (B) ou l'absence (B0) d'un d'antigène non marqué – Abscisse : concentration de MPO non marquée – A : limite de sensibilité – B : sensibilité à 50% de B/B0

1.3.2.1.3. Concentration en MPO chez les chevaux sains

La concentration en MPO dans le plasma n'est pas la même selon l'anticoagulant utilisé lors du prélèvement de sang. En effet, Deby-Dupont et al. ont montré que les valeurs étaient plus élevées lors de l'utilisation de tubes héparinés ou citratés que lors de l'utilisation de tubes EDTA. Ils ont alors décidé d'utiliser uniquement de l'EDTA pour le reste de leur étude car le laps de temps à ne pas dépasser entre le prélèvement et la centrifugation était plus long qu'avec un tube hépariné ou citraté. En effet, sur tube EDTA,

la concentration en MPO restait stable même si la centrifugation était effectuée plus de trois heures après le prélèvement, ce qui n'était pas le cas des autres tubes.

La concentration moyenne normale en MPO dans le plasma d'après leur étude sur 48 échantillons est de $69,5 \pm 19,4$ ng/ml. Une valeur supérieure à 129 ng/ml était considérée comme anormale.

De plus, dans cette étude, il a été observé que le stress du transport n'influençait pas cette valeur normale. Cependant, les valeurs usuelles d'un même individu pouvaient être assez variables d'une journée à l'autre.

De plus, il a été observé qu'une anesthésie et une opération chirurgicale pour des affections n'ayant aucun impact systémique (laryngoplastie, castration et arthroscopie) avaient un faible impact sur la concentration en MPO qui était alors discrètement augmentée de façon significative. Cependant celle-ci restait tout de même inférieure à la limite de 129 ng/ml fixée auparavant.

1.3.2.2. Muscle

En 2010, Serteyn *et al.*, 2010 décident de doser la concentration en MPO dans le muscle de chevaux avant et après effort. Pour cela, des micro-biopsies du triceps brachial étaient effectuées à l'aide d'une aiguille de 14 gauge. Le site de prélèvement était rapidement tondu puis désensibilisé avec 0,5 ml de mépivacaïne. Deux prélèvements étaient effectués, à gauche avant l'effort puis à droite après l'effort. Les biopsies étaient ensuite immédiatement congelées dans de l'azote liquide à -80°C jusqu'à utilisation. Les biopsies étaient alors homogénéisées dans 500ml de solution tampon PBS à 20 mmol/l, refroidi à la glace, au pH de 7,4. Après homogénéisation, la concentration en protéines de l'échantillon était mesurée en utilisant un dosage de l'acide bicinchoninique.

La concentration en MPO dans les extraits de muscle était ensuite déterminée à l'aide d'un kit ELISA développé par Franck *et al.*, (2005).

La limite de la mesure de MPO dans le muscle est le caractère invasif des biopsies musculaires. Les microbiopsies sont nettement moins invasives mais correspondent tout de même à un geste technique, nécessitant une légère anesthésie locale, pouvant donc difficilement être réalisé en routine.

1.3.2.3. Salive

1.3.2.3.1. Composition salivaire

La salive est composée chez l'homme d'environ 97 à 99,5% d'eau, d'électrolytes tels que le sodium, le potassium, les chlorures, les bicarbonates et le phosphore. On trouve également dans la salive des mammifères des enzymes dont l'amylase (absente chez les carnivores) et la lipase présente uniquement chez les jeunes pour permettre la digestion du lait. L'amylase est efficace à pH neutre ou basique ce qui explique que le pH de la salive soit compris entre 7 et 9 selon les espèces (Klein, 2013b).

La salive est composée d'une phase plutôt liquide/séreuse, contenant l'eau, les ions et les enzymes, et d'une phase plus visqueuses appelée muqueuse et contenant de la mucine (Akers et Denbow, 2013b).

Chez l'homme, on retrouve dans la salive la présence de lactoperoxydases qui catalysent l'oxydation de l'ion thiocyanate SCN^- par le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 pour former l'acide hypothiocyanique, connu comme étant un agent bactéricide. De plus trois enzymes peroxydases sont retrouvées dans la salive : la lactoperoxydase, la myéloperoxydase et l'éosinophile peroxydase. La myéloperoxydase est cependant celle qui présente l'activité peroxydase la plus importante. (Thomas *et al.*, 1994).

La salive a différentes fonctions et celles-ci sont variables en fonction des espèces. Elle permet (Akers et Denbow, 2013b) :

- De lubrifier et dissoudre les aliments afin de permettre la déglutition et la digestion ;
- D'alcaliniser le contenu du tractus digestif et donc de limiter l'acidité gastrique, en particulier chez les ruminants ;
- D'initier la digestion chez les animaux omnivores grâce à l'amylase ;
- De réguler la température corporelle chez le chien ;
- De favoriser une bonne hygiène buccale grâce aux lysozymes bactériostatiques, aux cyanures bactéricides et aux défensines qui attirent les leucocytes afin de protéger la bouche des microbes.

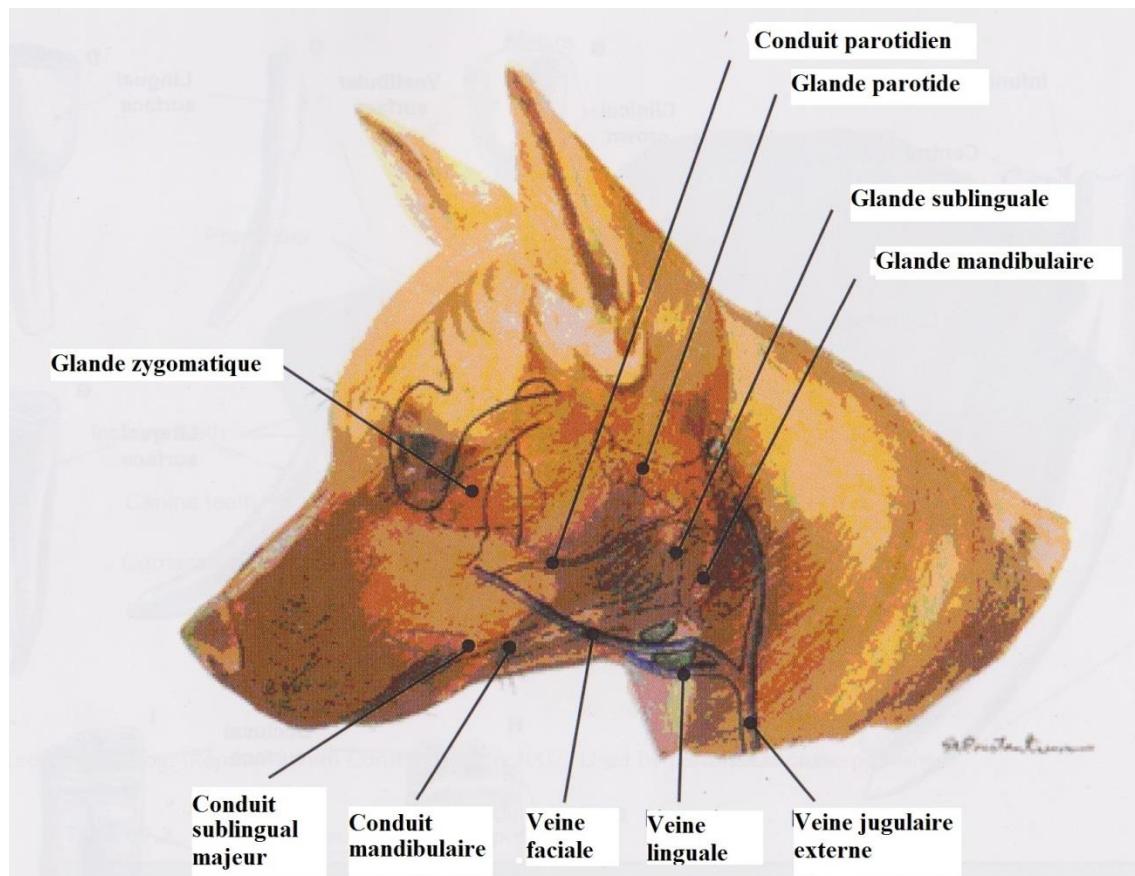
1.3.2.3.2. Sécrétion salivaire

La sécrétion salivaire se fait par l'intermédiaire de plusieurs glandes (Figure 11) dont l'importance varie selon les espèces. Certaines glandes sont à l'origine de la phase liquide de la salive, d'autres, de la phase muqueuse et d'autres encore ont une sécrétion mixte (Akers et Denbow, 2013b).

On trouve des glandes mineures directement à proximité de la cavité buccale qui sont des glandes mixtes : les glandes labiales, buccales et palatines, ainsi que des glandes majeures, plus éloignées de la cavité buccale. Parmi ces glandes majeures, on trouve (Akers et Denbow, 2013b):

- La glande parotide sécrétant la phase séreuse de la salive ;
- Les glandes mandibulaires mixtes ;
- La glande sublinguale à l'origine de la phase muqueuse de la salive.

Figure 11 : Principales glandes salivaires chez le chien (D'après Akers et Denbow, 2013b)



La sécrétion salivaire est continue mais peut augmenter par exemple lors des repas. La régulation de la sécrétion salivaire se fait par l'intermédiaire du système parasympathique et passe par le nerf facial pour les glandes mandibulaires et sublinguale et par le nerf glossopharyngien pour la glande parotide (Akers et Denbow, 2013c).

Chez l'homme, la production de salive est d'environ 1,5 litres par jour et 70% de la sécrétion est issue des glandes mandibulaires (Gilles *et al.*, 2006b)

1.3.2.3.3. Dosage de la MPO dans la salive

Plusieurs études ont eu pour but d'évaluer l'activité de la myéloperoxydase dans la salive.

En 1994, Thomas *et al.* ont expliqué que la mesure de l'activité peroxydase dans la salive inclut l'activité de la myéloperoxydase, de la lactoperoxydase et probablement d'une troisième enzyme, la peroxydase éosinophilique. L'objectif de leur étude était de mesurer le taux de chacune de ces enzymes dans la salive et de déterminer la contribution de chacune à l'activité peroxydase totale de la salive. L'activité de chaque enzyme était mesurée par chromatographie associée à de la spectrophotométrie. Au cours de cette étude, il a été démontré que si l'on centrifugeait la salive, la myéloperoxydase était retrouvée préférentiellement dans le culot. De plus, il semblerait que le taux de MPO dans la salive puisse être plus élevé chez le mâle que chez les femelles. La différence observée n'était cependant pas significative (Thomas *et al.*, 1994).

En 2016, Klangprapan *et al.* ont dosé l'activité de la myéloperoxydase dans la salive de patients thaïlandais afin de déterminer si celle-ci augmente en cas de maladie parodontale (Cf. 1.3.3.1.5.2). Pour cela, l'activité de la myéloperoxydase a été mesurée par colorimétrie en utilisant du 3,3'-diaminobenzidine comme substrat. Chaque prélèvement de salive était mélangé à une quantité précise d'une solution de 3,3'-diaminobenzidine et de potassium dihydrophosphate. Du H₂O₂ était ensuite ajouté afin de démarrer la réaction. Après une incubation de 20 minutes à température ambiante, de l'azoture de sodium NaN₃ permettant de stopper la réaction était ajouté. L'absorbance était ensuite mesurée à 465 nm (Klangprapan *et al.*, 2016).

1.3.2.4. Autres fluides biologiques

- Urines

En 2014, Ciragil *et al.* ont utilisé la myéloperoxydase et la xanthine oxydase comme nouveau marqueur dans la détection précoce des infections du tractus urinaire chez l'homme. Pour cela, 549 échantillons d'urines ont été prélevés auprès de patients dont les troubles permettaient de suspecter une infection du tractus urinaire. Les critères d'inclusion de cette étude étaient la dysurie, la pollakiurie, la douleur abdominale avec ou sans fièvre. Une fois l'urine prélevée par miction spontanée, les échantillons étaient transportés dans les 30 minutes pour la réalisation des analyses.

Une culture bactérienne était d'abord réalisée afin de former deux groupes d'échantillons, les échantillons positifs à la culture bactérienne d'une part et les négatifs d'autre part qui étaient utilisés comme témoins.

L'activité de la MPO était déterminée par la méthode O-dianisidine qui consiste à mélanger dans un tube à essai 0,3 ml de tampon phosphate, 0,3 ml de H₂O₂, 0,5 ml d'O-dianisidine. 10 ml d'urines étaient ensuite ajoutés à la préparation et le changement d'absorbance à 460 nm suivi pendant 10 minutes.

- Larmes (Arafat *et al.*, 2014)

En 2014, Arafat *et al.* réalisent une étude ayant pour but de doser le taux de MPO, de collagénase et de gélatinase dans les larmes de patients atteints du syndrome de Stevens-Johnson et de pemphigus oculaire cicatriciel. L'étude portait sur 7 yeux atteints de syndrome de Stevens-Johnson, 37 yeux atteints de pemphigus oculaire cicatriciel et 40 yeux témoins. Pour cette étude, les protéines lacrymales ont été récoltées par lavage des larmes ce qui permet d'en récolter une plus grande quantité chez des patients produisant peu de larmes. Pour cela, 60µl de liquide physiologique était appliqué sur la surface de l'œil puis les patients devaient lever les yeux sans cligner. Le liquide lacrymal était ensuite recueilli dans le cul de sac inférieur à l'aide d'une micro pipette. Le liquide lacrymal était ensuite centrifugé afin d'éliminer les débris cellulaires et le surnageant était conservé dans des tubes stériles à -80°C. Le taux de MPO était ensuite mesuré à l'aide d'un kit ELISA.

1.3.2.5. Dosage indirect de l'activité de la MPO

En 2000, Winterbourn C. et Kettle A. ont montré que l'analyse des taux de 3-chlorothyrosine et de 3,5-dichlorothyrosine par chromatographie gazeuse et par spectrométrie de masse était à cette époque la meilleure méthode disponible pour explorer l'implication de l'oxydation par la myéloperoxydase dans la pathogénie de maladies particulières. En effet, HOCl réagit avec les résidus tyrosyl des protéines pour former la 3-chlorotyrosine et la 3,5-dichlorotyrosine. Ces composés sont de parfaits biomarqueurs de HOCl car ils sont spécifiques de la réaction et sont chimiquement et biologiquement stables. HOCl ne pouvant être synthétisé en conditions physiologiques que par l'action de la myéloperoxydase, ses dérivés spécifiques sont donc également de bons marqueurs de l'activité de la myéloperoxydase (Hazen et Heinecke, 1997; Winterbourn et Kettle, 2000).

1.3.3. Intérêt clinique du dosage de la myéloperoxydase

Il n'existe à ce jour aucune technique de mesure rapide et aisée de la MPO dans les liquides biologiques. Cependant, il existe des kits de dosage ELISA accessibles pour toutes les espèces chez lesquelles la MPO a été isolée et séquencée, ce qui rend son dosage réalisable. Le laboratoire Franck Duncombe à Caen propose chez le cheval ce dosage en routine.

1.3.3.1. Chez l'homme

1.3.3.1.1. Maladies cardiaques

En 2013, Nussbaum et al. ont expliqué que la myéloperoxydase est à l'origine d'une diminution du monoxyde d'azote et d'une augmentation des espèces dérivées du nitrate et du chlore, ce qui a un impact sur le système vasculaire et contribue à la formation et à la propagation des maladies cardio-vasculaires (Figure 12 et Figure 13).

Figure 12 : Impact de la MPO sur le système vasculaire (D'après Nussbaum *et al.*, 2013)

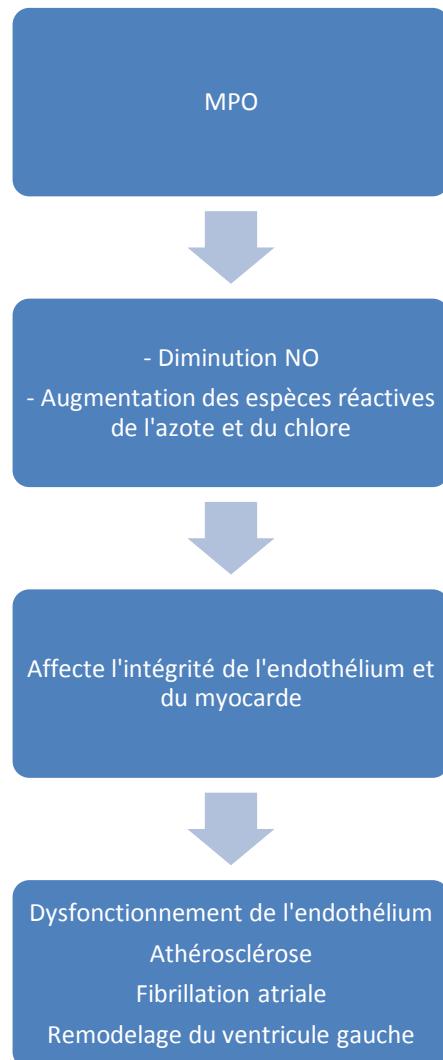
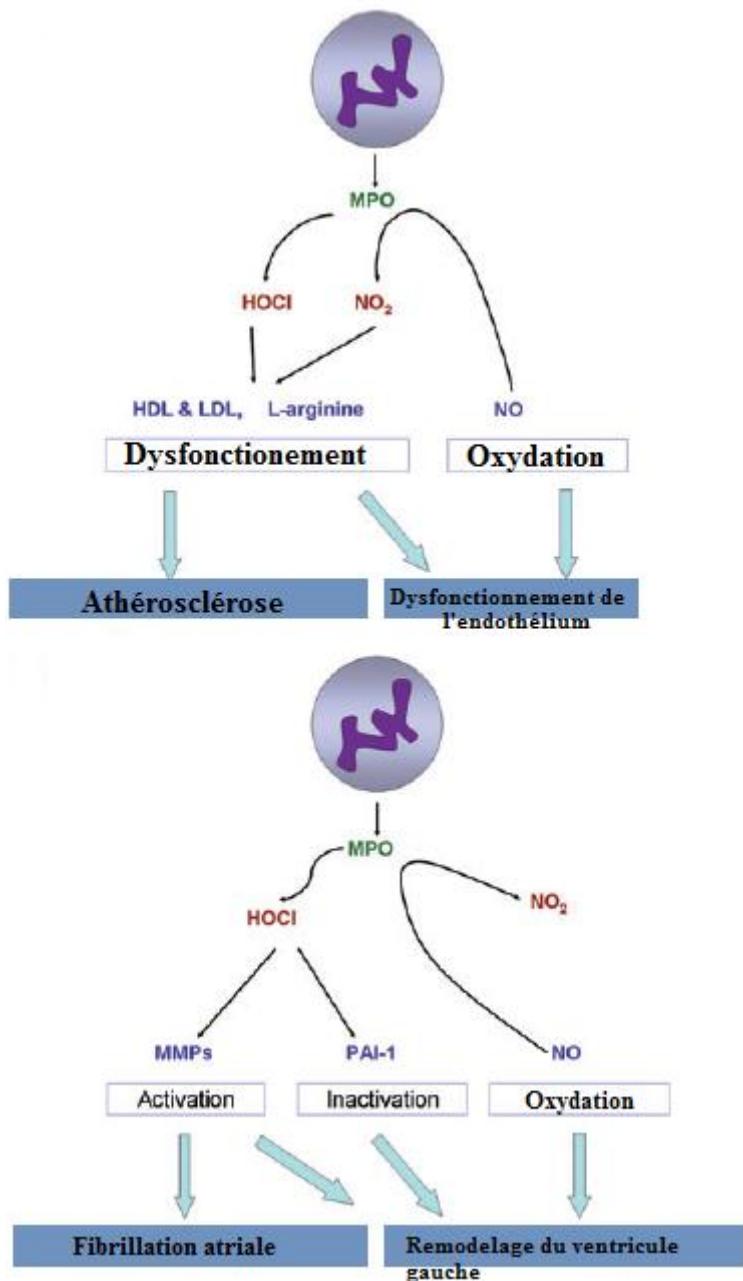


Figure 13 : contribution de la MPO au dysfonctionnement cardiovasculaire et myocardique (Nussbaum *et al.*, 2013)



1.3.3.1.1.1.1. Athérosclérose

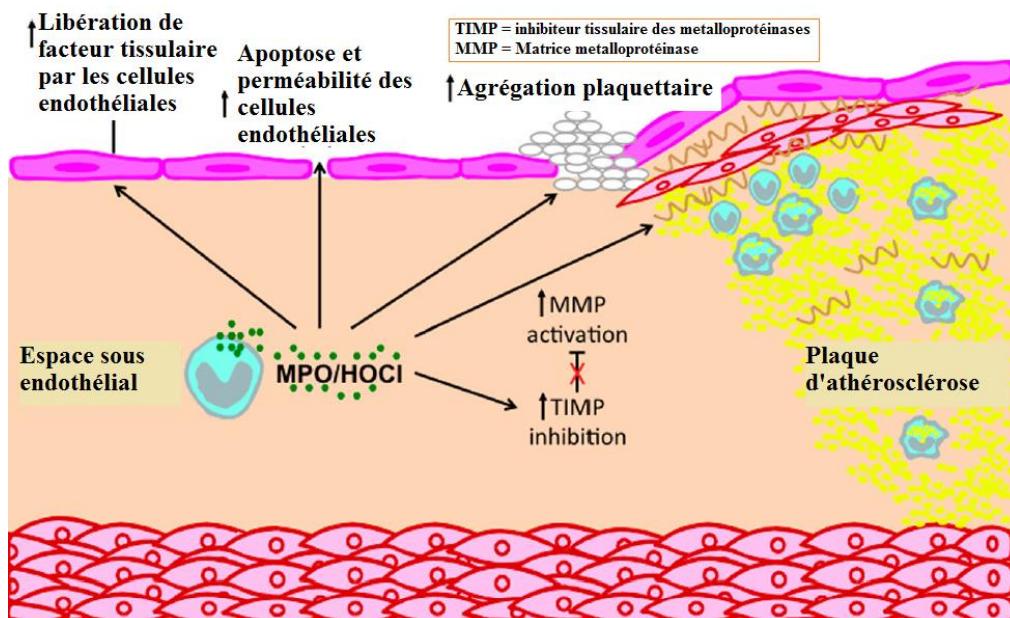
L'athérosclérose est un processus inflammatoire chronique à l'origine de lésions de la paroi des artères. Il s'agit de la cause majeure de maladie des artères coronaires (Teng *et al.*, 2017). Un taux élevé de LDL (transporteur majeur du cholestérol dans le plasma), est un facteur de risque majeur dans le développement des lésions d'athérosclérose. Cependant, ces

LDL doivent être biochimiquement modifiés ou oxydés avant de pouvoir jouer un rôle dans l'athérosclérose. En cas de stress oxydatif excessif, des lésions tissulaires oxydatives se mettent en place. La MPO et un bon nombre de ses produits dérivés sont retrouvés en quantités élevées dans les lésions d'athérosclérose. Il semblerait donc que la myéloperoxydase joue un rôle dans les réactions d'oxydation des tissus atteints d'athérosclérose (Podrez *et al.*, 2000). La MPO étant la seule voie connue pour générer des espèces chlorées réactives à des niveaux d'halogénures présents chez l'homme, la détection de ces produits d'oxydation chlorés stables est donc utilisée afin d'identifier les tissus où la MPO joue un rôle dans les lésions oxydatives observées telles que l'athérosclérose (Hazen et Heinecke, 1997).

De plus, Buttery *et al.*, (1996) ont montré que la nitrotyrosine est retrouvée en quantités importantes dans l'intima des artères atteintes d'athérosclérose chez l'homme et dans les LDL issus d'athérome humains. Or, deux voies dépendantes de la MPO aboutissent à la synthèse de nitrotyrosine. Ainsi, ce composé peut également être considéré comme un marqueur d'activité de la myéloperoxydase dans les lésions d'athérosclérose (Hazen *et al.*, 1999).

In vivo, il a été démontré que la MPO provoque une érosion superficielle des plaques d'athérosclérose et augmente la formation de thrombus au niveau des zones d'instabilité ou de rupture des plaques. La Figure 14 présente les rôles de la MPO et de ses dérivés dans l'instabilité des plaques d'athérosclérose (Teng *et al.*, 2017).

Figure 14 : Rôles de la MPO et de ses dérivés dans l'instabilité des plaques d'athérosclérose (D'après Teng *et al.*, 2017)



1.3.3.1.1.1.2. Insuffisance valvulaire mitrale

En 2017, Park *et al.* ont réalisé une étude afin d'évaluer la relation entre les niveaux sériques de MPO et la sévérité de la défaillance cardiaque due à une insuffisance chronique de la valve mitrale chez les chiens. L'étude portait sur 69 chiens atteints de différents stades de défaillance cardiaque due à une insuffisance chronique de la valve mitrale et 13 chiens sains servant de témoins. Les concentrations sériques en MPO chez les animaux ont été mesurées par un test ELISA en utilisant un anticorps anti-MPO spécifique à l'espèce canine. Cette étude semble conclure que les concentrations sériques en MPO diminuent à mesure que la sévérité de la défaillance cardiaque augmente. Cependant, l'étude présente plusieurs limites. D'une part, la population étudiée était insuffisante ce qui est à l'origine d'un manque de puissance statistique ; de plus, les taux de MPO détectés auraient pu être influencés par l'alimentation ou la prise de médicaments (Park *et al.*, 2017).

1.3.3.1.1.1.3. Syndrome coronarien aigu et maladie ischémique cardiaque

Le stress oxydatif et l'inflammation jouent un rôle essentiel dans la pathogénie des maladies des artères coronaires conduisant au syndrome coronarien aigu. L'infiltration des tissus par

les macrophages et les neutrophiles participe à la formation de lésions d'instabilité des plaques coronaires. La MPO étant sécrétée en cas d'inflammation, cette enzyme pourrait également être considérée comme un biomarqueur lors de syndrome coronarien aigu ou de maladie ischémique cardiaque. Il est démontré que la concentration sérique en MPO et son activité dans les leucocytes augmentent en cas de syndrome coronarien aigu et que cette augmentation est significativement corrélée à la présence du syndrome (Loria *et al.*, 2008). En 2017, Teng *et al.* ont rapporté que la myéloperoxydase peut être utilisée comme aide diagnostique et comme facteur pronostic chez les patients atteints de syndrome coronarien aigu (Teng *et al.*, 2017).

1.3.3.1.1.4. Risque cardiovasculaire chez les enfants obèses

L'obésité est associée à une inflammation générale chronique de bas grade et l'on sait désormais que la myéloperoxydase joue un rôle important dans les maladies inflammatoires chroniques comme les maladies cardiovasculaires. Ainsi, en 2012, Olza *et al.* ont étudié le taux de MPO dans le plasma d'enfants obèses et recherché si celle-ci pouvait être un biomarqueur de risque de développement d'une maladie cardiovasculaire. L'étude portait sur 446 enfants, 223 obèses et 223 de poids normal. Le taux de MPO était plus élevé dans le plasma des enfants obèses et était significativement corrélé à d'autres biomarqueurs de l'inflammation et de risque de maladie cardiovasculaire tels que la CRP, le MMP-9 et la resistine. Cette étude a permis de conclure que la MPO pouvait également être considérée comme un biomarqueur de l'inflammation associée au risque de développement d'une maladie cardiovasculaire chez les enfants obèses pré pubères (Olza *et al.*, 2012).

1.3.3.1.2. Maladies auto-immunes : arthrite rhumatoïde

Les maladies auto-immunes découlent d'une réponse immunitaire inappropriée de l'organisme contre ses propres antigènes. Cette réponse anormale est associée à un état inflammatoire prolongé, ainsi qu'une destruction des tissus et des organes atteints. L'arthrite rhumatoïde est une maladie auto immune caractérisée par des articulations synoviales inflammées de façon chronique. Le niveau de stress oxydatif a été détecté comme un facteur de développement et de progression. Dans le cadre de cette maladie, les articulations synoviales sont toujours infiltrées par des neutrophiles et des macrophages à l'origine de la

présence de nombreux médiateurs pro inflammatoires. De plus, il est aujourd’hui démontré que la dégradation du cartilage dans le cadre de l’arthrite rhumatoïde est due à la présence de HOCl issu des neutrophiles activés présents dans le liquide synovial. Dans leur étude en 2014, Wang et al. ont démontré que les patients souffrant d’arthrite rhumatoïde avaient un taux de MPO dans leur sérum supérieur à celui des patients souffrant d’autres maladies auto immunes. De plus, une association entre le taux de MPO et l’atteinte variable des patients a été observée, suggérant que la MPO joue un rôle dans le processus inflammatoire de la maladie. Dans cette étude, une corrélation entre le taux de MPO dans le sérum et la concentration en CRP a également été démontrée (Wang *et al.*, 2014).

1.3.3.1.3. Maladie d’Alzheimer

Comme expliqué plus haut, la myéloperoxydase exprimée par les cellules phagocytaires est à l’origine d’un ensemble d’oxydants qui contribuent aux dommages tissulaires lors d’un phénomène inflammatoire. En 2004, Green *et al.* ont démontré la présence et l’activité de la myéloperoxydase dans le cerveau humain et en particulier dans les neurones grâce à l’identification d’ARN messager de l’enzyme et à l’observation de MPO immunoréactive. La maladie d’Alzheimer est une maladie neuro dégénérative et plusieurs marqueurs ont permis de démontrer l’augmentation du stress oxydatif dans le cerveau des patients atteints d’Alzheimer. L’expression de la myéloperoxydase semble être augmentée en cas de maladie d’Alzheimer ce qui amène à supposer que l’enzyme participe au stress oxydatif impliqué dans la pathogénie des maladies neurodégénératives. De même, les produits d’oxydation caractéristiques de la myéloperoxydase (carbonyles, 3-nitrotyrosine) sont présents dans l’hippocampe des patients atteints de maladie d’Alzheimer ce qui confirme l’expression de la MPO dans le cerveau lors de cette maladie.

1.3.3.1.4. Maladies rénales

Beaucoup d’auteurs ont montré la présence de cellules contenant de la MPO ainsi qu’une activité de la MPO dans le cas de maladies rénales. Des expériences *in vivo* ont révélé que la MPO pouvait être à l’origine de la maladie glomérulaire, entraînant des modifications morphologiques du glomérule, des lésions endothéliales et mésangiales, ainsi que

l'activation des plaquettes et de réponses identiques à celles observées lors de glomérulonéphrite inflammatoire et proliférative chez l'homme (Ciragil *et al.*, 2014).

Les premières études n'ont pas pu montrer d'augmentation de l'activité en MPO dans les tissus rénaux enflammés (pyélonéphrite) bien que l'analyse histologique ait confirmé la présence d'un nombre anormalement élevé de neutrophiles (Ormrod *et al.*, 1987). Cependant, le développement de nouvelles techniques a par la suite permis à Hillegass *et al.*, (1990) de montrer qu'en cas d'inflammation rénale, l'activité en MPO était augmentée.

Dans le rein, les monocytes représentent la principale source de MPO en cas de glomérulopathie associée aux lipides. Le processus est très similaire au développement de l'athérosclérose associée aux lipides. La MPO est associée de manière extracellulaire et intracellulaire aux monocytes et macrophages à différents stades de sévérité de la lésion (Malle *et al.*, 2003).

De plus, l'augmentation de l'activité de la MPO dans les néphropathies diabétiques n'a pas été démontrée de manière significative. Ainsi, considérer la MPO comme un facteur pathogénique pertinent pour les complications rénales en cas de diabète reste une hypothèse et l'étude de patients diabétiques souffrant de déficience en MPO serait nécessaire pour clarifier le rôle de la MPO dans ce cas (Malle *et al.*, 2003).

Dans le cas de la néphrite passive de Heymann, les cellules épithéliales glomérulaires peuvent générer du peroxyde d'hydrogène grâce à l'oxydoréductase NADPH-dépendante par analogie aux granulocytes neutrophiles pendant la flambée respiratoire. Ceci semble démontrer que le système MPO-peroxyde d'hydrogène-chlorure joue un rôle essentiel dans la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène au niveau des membranes basales glomérulaires endommagées chez les patients atteints de glomérulonéphrite membranuseuse (Malle *et al.*, 2003).

1.3.3.1.5. Infections (tractus urinaire, maladie parodontale)

1.3.3.1.5.1. Tractus urinaire

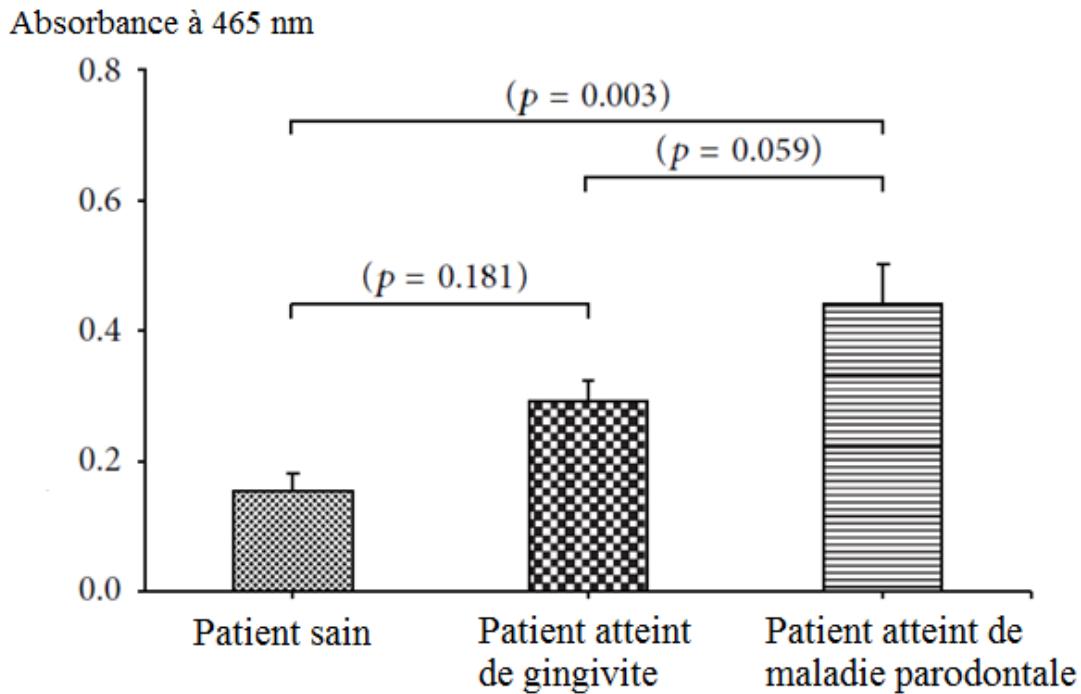
Lors d'infection urinaire, il semble que le taux de MPO dans les urines augmente. En effet, Ciragil *et al.*, (2014) ont observé que le taux de MPO dans les prélèvements d'urine stérile était de 414 U/l alors qu'il était souvent plus élevé en cas d'infection du tractus urinaire. Ce taux était le plus élevé (1546 U/l) lors de contamination à *E. coli* et le plus bas dans les urines infectées par *S. agalactiae* et *E. cloacae*. Le test développé présentait par ailleurs une sensibilité de 87% et une spécificité de 100%, ce qui permet d'accorder une confiance suffisante aux résultats présentés dans l'étude.

De plus, il a été démontré auparavant qu'il existait une corrélation significative entre la concentration en MPO et le nombre de leucocytes dans l'urine (Steinhoff *et al.*, 1997).

1.3.3.1.5.2. Maladie parodontale

Les maladies parodontales sont des infections bactériennes très répandues dans le monde. Les maladies parodontales regroupent les gingivites et les parodontites. Les gingivites sont une affection localisée uniquement aux gencives tandis que les parodontites se caractérisent par une atteinte du tissu dentaire. Ces maladies parodontales sont fréquemment associées à des maladies systémiques telles que le diabète sucré, les maladies ischémiques cardiaques ou le syndrome coronarien aigu. Le diagnostic précoce de ces maladies est essentiel pour la bonne réussite du traitement, ainsi que pour limiter leur gravité ou leurs complications. L'activité de la MPO dans la salive en tant que marqueur précoce de ces maladies a été étudiée par Klangprapan *et al.* en 2016 (Klangprapan *et al.*, 2016). Les résultats ont montré que l'activité salivaire de la MPO chez les patients atteints de parodontite était significativement plus élevée que chez les patients sains. De même, celle-ci était également plus élevée chez les patients atteints de parodontite que chez les patients atteints de gingivite même si la différence n'était pas statistiquement significative. Enfin, une différence de l'activité salivaire de la MPO entre les patients atteints de gingivite et les patients sains a été observée mais n'était pas significative (Figure 15).

Figure 15 : comparaison de l'activité salivaire de la MPO entre des patients sains, des patients atteints de gingivite et des patients atteints de parodontite (D'après Klangprapan *et al.*, 2016).



Une corrélation entre l'activité salivaire de la MPO et la gravité de la parodontite a également été observée. D'après cette étude, l'activité salivaire de la MPO peut être utilisée comme indicateur de risque de maladie parodontale. Ainsi des individus positifs à ce test devraient être référés à un dentiste en vue d'un examen clinique complet.

1.3.3.1.6. Suivi des exercices physiques

Les effets de l'exercice sur la fonction des neutrophiles sont largement influencés par l'âge, le sexe, le niveau sportif et la durée et l'intensité de l'effort. Un effort physique intense entraîne une mobilisation des leucocytes périphériques et l'importance de cette mobilisation est proportionnelle à l'intensité et à la durée de l'exercice (McCarthy et Dale, 1988). Un exercice modéré semble stimuler le système immunitaire (Sharp et Koutedakis, 1992), réduire les risques de maladies cardiovasculaires, favoriser une bonne santé et un bon état corporel (Blair *et al.*, 1992; Suzuki et Machida, 1995) et diminuer la sensibilité aux infections. Au contraire, un exercice physique de courte durée mais très intense, ou un exercice physique prolongé, semblent contribuer à une baisse des défenses immunitaires,

une augmentation des troubles du myocarde, une mort soudaine (Mittleman *et al.*, 1993) ou encore une augmentation du risque d'infections. Au cours de leur étude en 2000, Yamada *et al.*, ont étudié des prélèvements sanguins de skieurs de fond avant l'effort, juste après l'effort, une heure après l'effort et deux heures après l'effort. Ils ont démontré que le taux de leucocytes était augmenté de manière significative juste après l'effort ainsi que une heure et deux heures après l'effort. Le taux de neutrophiles augmentait de manière graduelle au cours du temps et était significativement plus important deux heures après l'effort qu'avant l'effort. De plus, la concentration des espèces réactives de l'oxygène, issues de l'activité de la MPO était également augmentée ce qui suggère une augmentation de l'activité oxydative des neutrophiles.

Melanson *et al.*, (2006) ont mesuré le taux de MPO dans le sang après un marathon et l'ont comparé à des marqueurs spécifiques de la santé cardiaque (créatine kinase, myoglobine, troponine T, et peptide natriurétique N-terminal type B) chez 24 athlètes. 92% des athlètes avaient un taux plus élevé de MPO après l'effort, ce qui reflète probablement une réponse inflammatoire systémique importante. De plus, une augmentation de la TnT et du NTproBNP a également été observée, ce qui suggère qu'une atteinte du myocarde en corrélation avec l'augmentation de la MPO ne peut être exclue.

1.3.3.2. Chez le cheval

Certaines affections équines telles que la fourbure ou les torsions intestinales avec sepsis peuvent être liées à une activation des neutrophiles, démarrant localement et s'étendant progressivement à la circulation systémique. La MPO semble être un marqueur caractéristique d'une activité inflammatoire dans la muqueuse intestinale (McConnico *et al.*, 1999).

1.3.3.2.1. Ischémie reperfusion lors de torsion intestinale

Deby-Dupont *et al.* ont montré en 1998 que la concentration plasmatique en MPO lors de torsion intestinale chez le cheval était fortement augmentée, allant de 200 à 732 ng/ml pour une valeur haute usuelle de 129 ng/ml. Cette augmentation est probablement due à une activation et une dégranulation des neutrophiles dans le sang suite à la translocation des endotoxines liées à la torsion ou bien au phénomène d'ischémie reperfusion locale

consécutif à la chirurgie. De plus, il est possible que ceci contribue au choc endotoxémique couramment observé comme complication dans ce type de pathologie intestinale. Ainsi, la torsion intestinale chez le cheval s'accompagne d'une augmentation de l'activité des neutrophiles qui peut être mise en évidence par l'augmentation de l'activité enzymatique des granulocytes comme la MPO dans les tissus (Deby-Dupont *et al.*, 1998)

Plusieurs années plus tard Grülke *et al.* ont également montré qu'une activité élevée de la MPO est détectée dans les muqueuses intestinales après ischémie reperfusion (Grulke *et al.*, 2008). Lors d'étranglement intestinal, une réaction inflammatoire et une ischémie se mettent en place, ce qui conduit à l'activation de l'endothélium vasculaire et à un appel des neutrophiles sur la zone atteinte. Tout ceci conduit à une aggravation des lésions par adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales et à leur toxicité pour ces cellules. La cytotoxicité en question est corrélée à la concentration en MPO active présente dans les liquides biologiques.

Enfin, en plus de l'élévation de la concentration plasmatique en MPO dans les affections intestinales équines, il a été montré que cette élévation est plus importante en cas d'étranglement intestinal, et qu'elle est particulièrement élevée chez les individus qui décèderont. La MPO semble donc également apporter un facteur pronostic dans ce type de pathologies (Grulke *et al.*, 1999; Koeffler *et al.*, 1985; McConnico *et al.*, 1999).

1.3.3.2.2. Suivi des exercices physiques

En 1996, Hines *et al.* ont recherché les effets de l'exercice sur le système immunitaire. Il s'avère qu'un exercice intense entraîne une augmentation des cellules de l'inflammation, en particulier les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes B chez l'homme et le cheval. Une leucocytose est observée après tout type d'effort et tend à augmenter avec l'intensité et la durée de l'effort. De plus tout comme lors d'un effort intense, le nombre de neutrophiles augmente lors d'exercice peu intense mais prolongé chez l'homme et chez les animaux testés en laboratoire.

Cependant, une étude a montré une diminution de l'activité des neutrophiles du sang périphérique lors d'un effort intense chez des chevaux non entraînés. En particulier, une diminution du chimiotactisme des neutrophiles a été observée associée à une diminution de 60

la flambée respiratoire dans laquelle la myéloperoxydase joue un rôle essentiel (Wong *et al.*, 1992). Ainsi, l'effet de l'exercice sur le système immunitaire n'est pas tout à fait élucidé mais il semble tout de même qu'il existe. Le stress causé par l'exercice pourrait avoir des effets variables sur le système immunitaire, parfois en le stimulant, parfois en l'inhibant. Cette relation entre l'exercice et le système immunitaire tend à être précisée, en particulier parce que l'exercice pourrait avoir un intérêt thérapeutique en cas de maladies caractérisées par une immunosuppression (Hines *et al.*, 1996).

En 2010, Seytern *et al.* ont cherché à montrer l'impact d'une course d'endurance de 120 km sur la concentration musculaire et plasmatique en myéloperoxydase et élastase. En effet, un exercice intense peut induire la dégranulation excessive des neutrophiles, conduisant à une augmentation de la concentration plasmatique en MPO et en élastase. Ces enzymes ayant des propriétés pro inflammatoires et pro oxydatives pourraient jouer un rôle dans les dommages musculaires causés par un exercice intense. L'objectif de l'étude était donc de mesurer les concentrations plasmatiques et musculaires en MPO et en élastase et de les corrélérer à une éventuelle souffrance musculaire induite par l'exercice. Seytern *et al.* ont observé une augmentation du nombre de neutrophiles circulants, de la concentration en MPO et de la concentration en élastase chez les chevaux d'endurance 2 heures après la course. Une seule séance d'exercice intense a suffi à diminuer temporairement la fonction des neutrophiles. De plus cette augmentation était corrélée de manière significative à l'augmentation de la créatine kinase dans le muscle, et au niveau sérique. Il a également été observé dans cette étude que l'inhibition de l'élastase conduisait à une diminution de l'activité de la MPO dans les cellules musculaires squelettiques, ce qui suggère une coopération de l'élastase et de la MPO dans les lésions musculaires. L'accumulation de MPO dans le muscle pourrait participer à l'altération des membranes cellulaires, conduisant à l'excrétion de créatines kinases (Serteyn *et al.*, 2010).

De plus tous les chevaux n'ont pas montré la même intensité dans la réponse inflammatoire musculaire face à l'exercice. Cela peut être expliqué par le fait que les chevaux n'ont pas effectué le même effort, n'ont pas les mêmes capacités ou le même entraînement.

Ainsi, la MPO est une enzyme dont le rôle dans l'inflammation est de nos jours bien connu. De nombreuses études ont également permis de démontrer qu'elle était un marqueur de

l'inflammation intéressant lorsqu'elle était dosée dans le sang, et ce dans de nombreuses pathologies. Cependant son utilisation en tant que marqueur de l'inflammation dans d'autres milieux biologiques reste encore très peu étudiée. De même, le dépistage sanguin de l'inflammation d'un organisme est aujourd'hui bien développé, mais peu de méthodes non invasives de dépistages dans d'autres milieux sont pratiquées. De ce fait, nous avons choisi d'étudier le dépistage salivaire de l'inflammation par l'intermédiaire de cette enzyme dans la seconde partie de ce travail.

2. DEUXIEME PARTIE : ETUDE

EXPERIMENTALE

2.1. Contexte et objectif de l'étude

Au cours des courses longues distances, aussi bien chez le cheval d'endurance de haut niveau que chez le chien de traineau, de nombreux troubles sont détectés et amènent parfois à éliminer l'animal de la course.

Les troubles fréquemment rencontrés chez le cheval d'endurance peuvent être classés en deux familles : les boiteries et les troubles métaboliques. Les boiteries peuvent être de diverses origines : myopathie d'effort, crampe, dorsalgie, contusion des pieds, lésions articulaires, tendinites, fourbure (SENA, 2007).

Les troubles métaboliques les plus fréquemment observés sont la déshydratation, le coup de chaleur, le syndrome d'épuisement, le flutter diaphragmatique, les coliques et les troubles rénaux.

Au cours d'une étude en 2001, il a été montré que les motifs d'élimination les plus courant sont les boiteries (57%), puis les troubles métaboliques (39%) (MEYRIER, 2003).

Chez le chien de traineau, les troubles fréquemment rencontrés sont les troubles locomoteurs, en particulier les affections podales (dermites interdigitées, lésions des ergots, lésions sous unguéales, lésions des coussinets), viennent ensuite les affections distales puis les traumas au niveau des membres. Des troubles digestifs (dysorexie, vomissements, diarrhée plus ou moins hémorragique) ainsi que des troubles respiratoires (toux, augmentations des bruits respiratoires, difficultés inspiratoires) sont également observés (ROGALEV, 2011).

Etant donné son activité dans l'organisme, la myéloperoxydase (MPO) est probablement impliquée dans de nombreux mécanismes rencontrés dans ces entités pathologiques.

Ainsi, cette étude a pour objectif de mettre en place un test simple, rapide, non invasif, réalisable sur le terrain permettant de mettre en évidence de manière précoce des animaux en souffrance physique au cours d'une course. L'utilisation de ce test lors des étapes des courses d'endurance équestre ou de traineau serait alors un complément à l'examen clinique

et pourrait conforter le vétérinaire en charge des examens intermédiaires dans son choix de refuser ou non le départ d'un animal sur les étapes suivantes. Pour cela, nous devons disposer d'un marqueur fiable, objectif, répétable, et dont le résultat soit corrélé à l'état clinique de l'animal. Cette étude s'intéressera à vérifier la répétabilité et la fiabilité de la MPO pour cet usage.

Plusieurs méthodes ont été étudiées, l'objectif étant de déterminer leur répétabilité ainsi que leur reproductibilité, en comparant différents moyens de prélèvement, et différentes dilutions pour les analyses dans nos deux espèces cibles : le chien et le cheval.

2.2. Matériel et méthode

2.2.1. Animaux prélevés

2.2.1.1. Les chiens

Les prélèvements ont été effectués sur les chiens appartenant au laboratoire de reproduction de l'ENVA. Les 21 chiens testés pour la mise au point de la méthode de prélèvements sont tous des Beagles âgés de 1 an à 12 ans, de sexe variés (trois mâles entiers, un mâle castré et 17 femelles entières). Lors de l'étude de la répétabilité, deux femelles étaient gestantes. Les autres femelles étaient toutes en anœstrus. Lors de l'étude de la reproductibilité, deux femelles étaient également gestantes, une était en metoestrus et une était en œstrus. Trois chiennes, soit 13,6%, avaient du tartre en quantité importante et 5 chiennes, soit 22,7 %, étaient plus maigres que les autres avec une note d'état corporelle de 3 sur 9 contre 6 sur 9 pour les autres. Les informations concernant les animaux prélevés sont regroupées dans le Tableau 3.

Tous les animaux présentaient un bon état général et n'étaient atteints d'aucune maladie systémique connue. Nous avons procédé box par box au sein du chenil, chaque animal était sorti du box, amené en salle de prélèvement, son identité était contrôlée par lecture de son transpondeur afin de s'assurer de ne pas prélever deux fois le même animal et les prélèvements étaient effectués selon les méthodes exposées par la suite.

Tableau 3 : Caractéristiques des chiens au moment du prélèvement pour tester chaque méthode.

| Animal testé | Race | Sexe | Age | Clinique |
|--------------|--------|-------------|---------|---|
| 973427 | Beagle | Mâle | 1 an | Chien d'expérimentation |
| 973349 | Beagle | Mâle | 1,5 ans | Chien d'expérimentation |
| 284994 | Beagle | Femelle | 3 ans | Chien d'expérimentation |
| 380846 | Beagle | Femelle | 2 ans | Chien d'expérimentation |
| 314641 | Beagle | Mâle castré | 12 ans | Chien d'expérimentation |
| 973323 | Beagle | Femelle | 2 ans | Chien d'expérimentation |
| 339546 | Beagle | Femelle | 3 ans | Chien d'expérimentation |
| 166657 | Beagle | Femelle | 6 ans | Chien d'expérimentation |
| 262430 | Beagle | Femelle | 1 an | Chien d'expérimentation |
| 361220 | Beagle | Femelle | 3 ans | Chien d'expérimentation |
| 766905 | Beagle | Femelle | 2 ans | Chien d'expérimentation, NEC = 3/9 |
| 361586 | Beagle | Femelle | 2 ans | Chien d'expérimentation |
| 763843 | Beagle | Femelle | 1,5 ans | Chien d'expérimentation, NEC = 3/9 |
| 660610 | Beagle | Femelle | 1,5 ans | Chien d'expérimentation |
| 382069 | Beagle | Femelle | 2 ans | Chien d'expérimentation, NEC = 3/9, tartre et gingivite |
| 730875 | Beagle | Femelle | 1,5 ans | Chien d'expérimentation, tartre, NEC = 3/9 |
| 455498 | Beagle | Femelle | 2 ans | Chien d'expérimentation |
| 197310 | Beagle | Femelle | 6 ans | Chien d'expérimentation, tartre |
| Beau gosse | Beagle | Mâle | 8 ans | Chien d'expérimentation |
| 759131 | Beagle | Femelle | 1,5 ans | Chien d'expérimentation, NEC = 3/9 |
| 393064 | Beagle | Femelle | 2 ans | Chien d'expérimentation |

2.2.1.2. Les chevaux

Les chevaux prélevés étaient tous issus du centre équestre la SHEVA. Ce sont tous des chevaux de club, utilisés pour des cours d'équitation « loisir », dont huit juments et huit hongres. Tous les animaux étaient sains, et aucune jument n'était en chaleurs. Les animaux testés sont représentés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Caractéristiques des chevaux au moment du prélèvement pour tester chaque méthode.

| Animal testé | Sexe | Age | Clinique |
|--------------|--------|--------|----------------|
| A dix neuf | Jument | 8 ans | Cheval de club |
| Valentin | Hongre | 9 ans | Cheval de club |
| Poésie | Jument | 15 ans | Cheval de club |
| Nougat | Hongre | 17 ans | Cheval de club |
| Une surprise | Jument | 10 ans | Cheval de club |
| Lutin | Hongre | 19 ans | Cheval de club |
| Vasco | Hongre | 9 ans | Cheval de club |
| Cannabis | Jument | 13 ans | Cheval de club |
| Ukaline | Jument | 10 ans | Cheval de club |
| Atchoum | Jument | 8 ans | Cheval de club |
| Quavaletti | Hongre | 14 ans | Cheval de club |
| Rivage | Hongre | 13 ans | Cheval de club |
| Teckila | Jument | 11 ans | Cheval de club |
| Querida | Jument | 14 ans | Cheval de club |
| Sango | Hongre | 12 ans | Cheval de club |
| Milou | Hongre | 18 ans | Cheval de club |

2.2.2. Principe du test

2.2.2.1. Utilisation initiale des bandelettes HEMASTIX

Les bandelettes HEMASTIX® du laboratoire SIEMENS (Annexe 1) sont des bandelettes destinées à détecter la présence de sang dans l'urine. L'urine est alors prélevée dans un flacon propre et la bandelette y est immergée. Soixante secondes après avoir retiré

la bandelette de l'urine, la zone réactive est comparée à l'échelle colorimétrique figurant sur l'étiquette du flacon (Laboratoire SIEMENS, 2011).

2.2.2.2. Principe chimique du test

Le test repose sur l'activité peroxydase de l'hémoglobine qui catalyse la réaction du dihydroperoxyde de diisopropylbenzène et du tétraméthyl-3,3',5,5'-benzidine. La couleur obtenue varie entre l'orange et le vert, et une concentration élevée de sang peut induire une coloration bleue (Laboratoire SIEMENS, 2011). L'activité de peroxydase de la MPO étant considérée comme la plus importante, la présence de cette enzyme dans un milieu entraînerait également une réaction colorimétrique. De plus, la MPO est l'enzyme à activité peroxydase la plus présente dans la salive lors d'inflammation générale de l'organisme. C'est pourquoi nous supposons que lors d'une inflammation, la réaction colorimétrique de la bandelette est proportionnelle à la quantité de MPO présente dans la salive.

2.2.3. Prélèvements

2.2.3.1. Méthodes de prélèvements et de traitement du prélèvement

Les quatre méthodes ci-dessous ont été testées chez le chien et le cheval.

2.2.3.1.1. Méthode 1

La première méthode consiste à introduire directement la bandelette dans la cavité buccale du chien, la frotter légèrement contre les gencives et sous la langue pendant 30 secondes puis la retirer afin de lire le résultat (Cf. 2.2.4).

2.2.3.1.2. Méthode 2

La seconde méthode consiste à prélever la salive à l'aide d'un écouvillon. Celui-ci est introduit dans la bouche du chien puis frotté contre les gencives ou sous la langue jusqu'à avoir une quantité de salive suffisante pour l'imbiber. L'écouvillon est ensuite placé dans un petit tube contenant 300 μ L de NaCl 0,9% pendant 30 secondes. La bandelette est ensuite trempée dans ce tube jusqu'à imbibition complète puis sortie pour la lecture du résultat.

2.2.3.1.3. Méthode 3

La troisième méthode consiste à prélever la salive à l'aide d'un écouvillon tout comme dans la méthode 2 puis à diluer la salive dans un petit tube contenant 600µL de Nacl 0,9% pendant 30 secondes. Ensuite, la bandelette est trempée dans ce tube durant 5 secondes afin d'assurer une imbibition complète puis sortie pour la lecture du résultat.

2.2.3.1.4. Méthode 4

La quatrième méthode consiste à prélever la salive à l'aide d'un écouvillon de la même manière que les méthodes 2 et 3. La salive est ensuite déposée directement sur la bandelette par roulement de l'écouvillon, sans dilution préalable.

2.2.3.2. Planning de réalisation des prélèvements

2.2.3.2.1. Chez le chien

Afin de tester la répétabilité de chaque méthode, deux prélèvements à une minute d'intervalle ont été réalisés pour chaque méthode. La répétabilité a été testée sur 16 chiens issus du groupe présenté dans la partie 2.2.1.1. Les prélèvements pour l'étude de la répétabilité ont été effectués le 31 janvier 2018.

Afin de tester la reproductibilité temporelle de chaque méthode, les prélèvements ont été effectués à 24 heures d'intervalle, au même moment de la journée afin de se mettre au maximum dans les mêmes conditions que la veille. La reproductibilité a été testée sur 17 chiens également issus du groupe présenté en 2.2.1.1. Les prélèvements pour l'étude de la reproductibilité ont été effectués les 9 et 10 novembre 2017.

2.2.3.2.2. Chez le cheval

Chez le cheval, trois prélèvements par méthode ont été effectués. Deux prélèvements le même jour à une minute d'intervalle afin de tester la répétabilité, puis un troisième prélèvement le lendemain, 24 heures plus tard. Tout comme chez le chien, les prélèvements du lendemain ont été effectués à la même heure de la matinée pour fixer au maximum les conditions de réalisation. Les prélèvements étaient effectués le matin, avant tout exercice physique et avant que les animaux ne soient nourris. La répétabilité et la reproductibilité ont été testées sur les 16 chevaux présentés en 2.2.1.2 pour les méthodes 1 et 4. Les méthodes 2

et 3 n'ont été réalisées que sur 15 chevaux, l'un d'eux n'étant pas disponible le jour des prélèvements (Cannabis).

2.2.4. Lecture des résultats

2.2.4.1. Comparaison à l'échelle colorimétrique et corrélation avec la quantité de MPO dans la salive

Une fois la bandelette imbibée de salive ou de salive diluée dans du NaCl 0,9%, sa coloration est comparée à l'échelle colorimétrique figurant sur l'étiquette du flacon toutes les trente secondes pendant 2 minutes (figure 16). La lecture a été faite dans la même salle, lumière allumée et par une seule personne afin d'assurer la reproductibilité de lecture. Les résultats étaient ensuite inscrits de manière manuscrite dans un tableau prévu à cet effet puis retranscrits en fin de journée informatiquement (Annexe 2).

Figure 16 : Exemple de lecture de résultat (traces)



Pour chaque bandelette, cinq résultats étaient possibles : négatif, traces, une croix, deux croix puis trois croix. Grâce à une gamme fournie par le laboratoire MPO2max donnant en

fonction du coloris la quantité de myéloperoxydase présente dans la salive humaine, et sous l'hypothèse que la myéloperoxydase canine soit très proche de la myéloperoxydase humaine, des coefficients ont été attribués à chacun de ces résultats pour que chaque coloris soit représentatif d'une quantité de MPO dans la salive testée. Ces correspondances sont regroupées dans le tableau 5.

Tableau 5: Correspondance entre le résultat de la bandelette et la quantité de MPO contenue dans la salive.

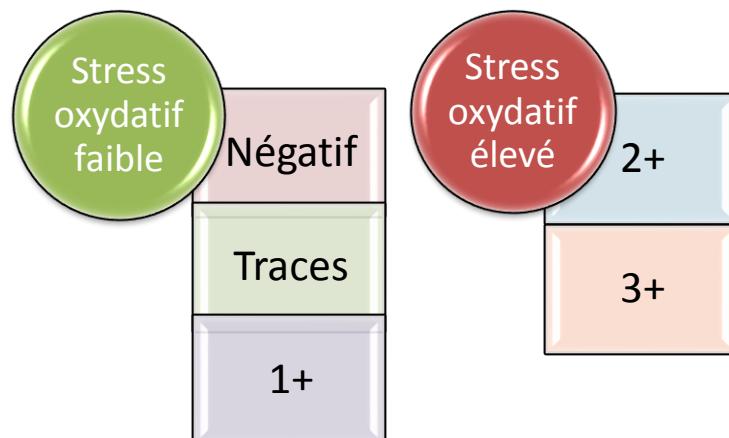
| Résultat de la bandelette | Couleur associée | Correspondance en quantité de MPO |
|---------------------------|------------------|-----------------------------------|
| Négatif | | 0 |
| Traces | | 2 |
| + | | 5 |
| ++ | | 7 |
| +++ | | 10 |

D'un point de vue clinique, nous avons considéré que la vitesse de réaction était importante. Ainsi, nous avons choisi d'étudier les résultats à 30 secondes (en début de réaction), puis à 120 secondes (en fin de réaction). Ainsi, un animal dont les résultats sont élevés (deux croix et trois croix) à 30 secondes et à 120 secondes est considéré comme « à risque », un animal dont les résultats sont faibles (négatif, traces ou une croix) à 30 secondes mais élevés à 120 secondes est considéré comme « douteux, à reconstrôler » et un animal dont les résultats sont faibles à 30 secondes et à 120 secondes est considéré comme « sain ».

2.2.4.2. Etablissement d'un système binaire pour l'étude du coefficient Kappa

Afin d'utiliser le coefficient Kappa comme méthode d'analyse statistique, nous avons regroupé les résultats en deux catégories récapitulées dans la Figure 17. En effet nous avons considérés que les animaux dont le résultat était négatif, traces ou 1+ correspondaient à des animaux réagissant peu et dont le stress oxydatif ou l'état inflammatoire pouvait être considéré comme faible. Au contraire, les animaux à 2+ ou 3+ correspondaient à des animaux réagissant beaucoup et dont le stress oxydatif ou l'état inflammatoire pouvait être considéré comme élevé. Pour faire ces catégories, nous nous sommes appuyées sur la gamme faisant correspondre la couleur obtenue à la bandelette avec la quantité de MPO présente dans l'échantillon testé fournie par le laboratoire MPO2max et présentée dans le tableau 5.

Figure 17 : Regroupement des résultats en système binaire



2.2.5. Analyse statistique des résultats

La répétabilité ainsi que la reproductibilité ont été testées selon trois méthodes statistiques :

- le calcul du coefficient de Lin, purement statistique, qui se base sur deux séries de mesures quantitatives ;

- La méthode de Bland et Altman dont l'approche est plus clinique, considérée comme une méthode de référence, qui se base également sur deux séries de mesures quantitatives ;
- Le calcul du coefficient kappa qui se base sur deux séries de mesures binaires, permettant de regrouper les résultats en deux catégories : les animaux présentant un stress oxydatif élevé et ceux présentant un stress oxydatif faible.

La concordance a été étudiée à 30 secondes puis à 120 secondes et l'étude était considérée comme répétable et reproductible si les deux mesures étaient suffisamment concordantes.

2.2.5.1. Coefficient de Lin

Le coefficient de concordance Lin est une méthode numérique paramétrique d'étude de la concordance. Il consiste à placer sur un graphique des points correspondant chacun à un individu testé. L'axe des abscisses correspond à la valeur du premier prélèvement et l'axe des ordonnées à la valeur du second prélèvement. Le nuage de points est ensuite comparé à une droite à 45° correspondant à la concordance parfaite. La valeur du coefficient de Lin est comprise entre -1 et +1. La concordance est considérée comme parfaite lorsque le coefficient est égal à +1, nulle lorsqu'il est égal à 0. Enfin, on considère que la discordance entre les deux séries de mesures est parfaite s'il est égal à -1. Le coefficient de Lin est un critère purement statistique. Il quantifie la précision de la concordance, mais également l'écart systématique entre les deux séries de mesures, ce qui représente l'exactitude de la concordance (Lin, 1989).

L'interprétation de ce coefficient est récapitulée dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Interprétation des valeurs du coefficient de concordance de Lin (CC Lin) (Partik *et al.*, 2002)

| CC Lin | Interprétation |
|-----------|----------------|
| < 0.50 | Inacceptable |
| 0.51-0.60 | Mauvais |
| 0.61-0.70 | Médiocre |
| 0.71-0.80 | Satisfaisant |
| 0.81-0.90 | Assez bon |
| 0.91-0.95 | Très bon |
| >0.95 | Excellent |

Cette méthode ne tenant en aucun cas compte de la clinique, il est fortement conseillé de l'associer au graphique de Bland et Altman (Cf.2.2.5.2).

2.2.5.2. Méthode de Bland et Altman (Bland et Altman, 1999; Giavarina, 2015)

La méthode de Bland et Altman est également une méthode d'analyse de données quantitatives. Elle vient compléter le coefficient de corrélation de Lin. Il s'agit d'une méthode clinique d'évaluation de la concordance puisque le critère de concordance est un critère « clinique » fixé *a priori* par l'investigateur. Nous avons fixé cet écart avant l'analyse des résultats. Nous avons considéré qu'un écart de 3 en valeur absolue entre les deux mesures chez un animal était acceptable d'un point de vue clinique. En effet, nous pensons que la différence clinique entre un résultat négatif, un résultat montrant des traces de MPO et un résultat à 1+ n'est pas significative, de même qu'entre un résultat à 2+ ou à 3+. De plus, la quantité de MPO dans le prélèvement peut varier avec le stress, la présence de tartre à l'endroit du prélèvement ou encore la quantité de salive prélevée. Ainsi, pour cette étude, la méthode est considérée comme répétable si la très grande majorité des écarts (en valeur absolue) - soit 95% - entre les deux séries de mesure est inférieure à 3. La représentation graphique de Bland et Altman permet d'obtenir (Desquibet, 2017) :

- Le biais, c'est-à-dire la moyenne des écarts de mesures entre les deux séries. Celui-ci n'a d'intérêt que dans le cas où l'on compare une méthode de

prélèvement à une méthode de référence, ce qui n'est pas le cas dans notre étude. Dans l'étude de la répétabilité et de la reproductibilité spatio-temporelle, la valeur du biais ne nous intéresse pas car il n'y a aucune raison que l'un ou l'autre des prélèvements soit sur ou sous-estimé par rapport à l'autre (droite rouge sur les graphiques) ;

- Les limites d'agrément inférieure et supérieure à 95%, qui sous l'hypothèse que l'ensemble des écarts de mesures suive une loi normale, 95% des écarts de mesures se trouvent entre ces deux limites (droites vertes sur les graphiques) ;
- Le coefficient de répétabilité qui signifie que 95% des écarts sont inférieurs en valeur absolue à cette valeur. Il s'agit de la valeur à laquelle il faut comparer 3.

2.2.5.3. Coefficient kappa

Le calcul du coefficient Kappa est une méthode d'analyse de la concordance entre deux séries de mesures binaires. Ce coefficient a pour but d'estimer la concordance « véritable » entre deux mesures en tenant compte de la concordance pouvant être uniquement due au hasard.

La formule du coefficient Kappa est la suivante (Desquillet, 2017) :

$$K = \frac{\text{Proportion d'accords observés} - \text{proportion d'accords dus au hasard}}{1 - \text{proportion d'accords dus au hasard}}$$

Ainsi, d'après cette formule, si la proportion d'accords dus au hasard est égale à 1, il est impossible de calculer ce coefficient.

Le coefficient Kappa est un nombre réel, compris entre -1 et +1. Plus il est proche de 1 et plus la concordance entre les deux séries de mesures est élevée.

L'interprétation du coefficient Kappa est récapitulée dans le Tableau 7 :

Tableau 7 : Interprétation des valeurs du Kappa (Landis et Koch, 1977)

| Kappa | Interprétation |
|------------------|-----------------------------|
| < 0 | Très mauvais (Poor) |
| 0–0.20 | Mauvais (Slight) |
| 0.21-0.40 | Passable (Fair) |
| 0.41-0.60 | Moyenne (Moderate) |
| 0.61-0.80 | Bonne (Substantial) |
| 0.81-1.00 | Très bonne (Almost perfect) |

2.3. Résultats

2.3.1. Chez le chien

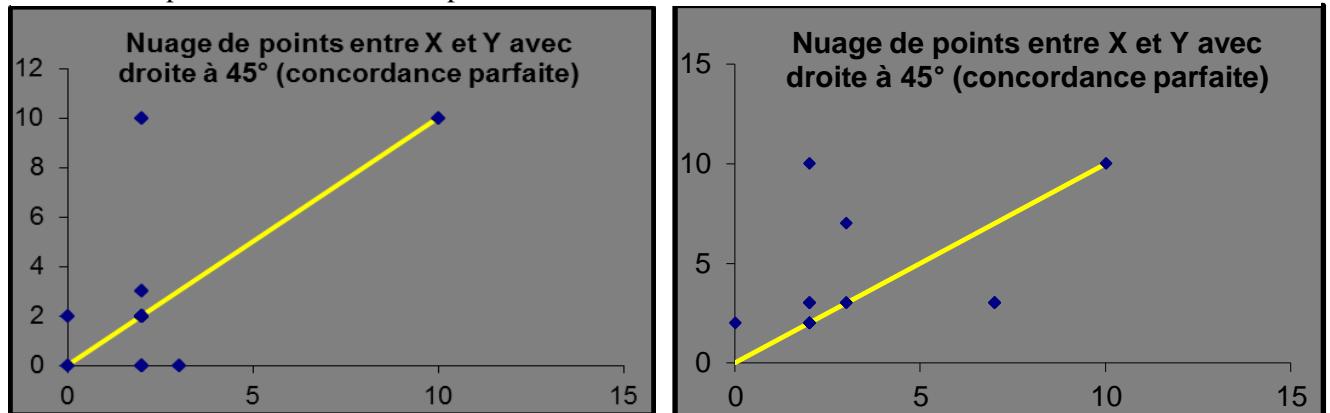
2.3.1.1. Répétabilité

2.3.1.1.1. Méthode 1

Coefficient de Lin

En comparaison des deux séries de mesure, le coefficient de Lin était de 0,59 soit mauvais à 30 secondes et de 0,39 soit inacceptable à 120 secondes. La droite jaune de la Figure 18 représente la ligne sur laquelle devraient se trouver les points en cas de concordance parfaite. Chaque point bleu représente un animal, l'axe des abscisses représente le résultat du premier échantillon et l'axe des ordonnées le résultat du deuxième. Plus les points sont éloignés de cette droite et moins la concordance est bonne. Lors des prélèvements, plusieurs animaux ont donné les mêmes résultats lors du premier et du deuxième prélèvement. Ainsi, plusieurs points sont parfois superposés sur les représentations graphiques. Ainsi, sur cette figure, on se rend compte que certains points sont très éloignés de la droite de concordance parfaite. Ceci justifie que le coefficient de Lin corresponde à une concordance mauvaise à 30 secondes. A 120 secondes, le nombre de points éloignés de la droite jaune est encore plus élevé, ce qui justifie un coefficient de Lin mauvais. Ainsi, d'après cette analyse statistique, la méthode 1 n'est pas répétable.

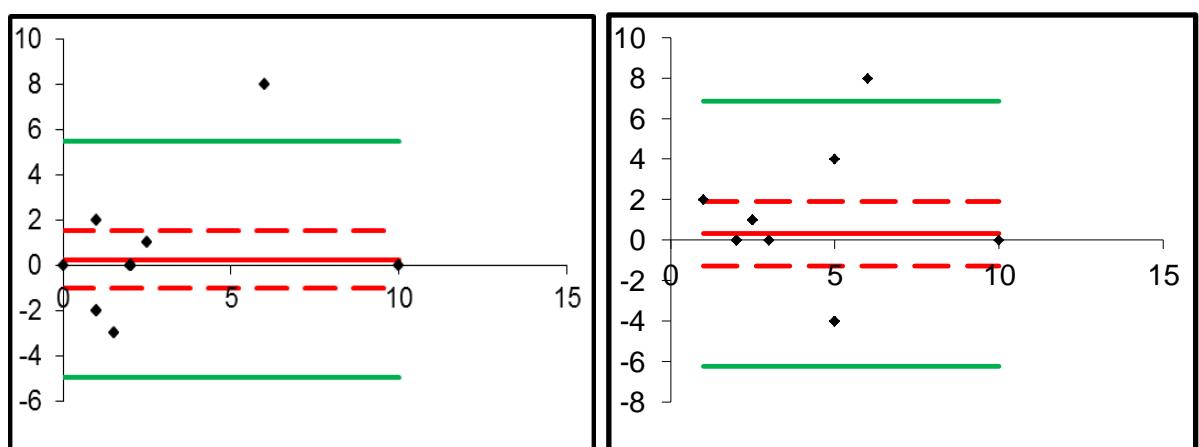
Figure 18 : Représentation graphique des mesures sur 16 prélèvements salivaires de chiens avec la première méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite), avec en abscisse la valeur mesurée dans le premier échantillon et en ordonnée la valeur mesurée dans le second échantillon. La droite à 45° représente la concordance parfaite – Etude de la répétabilité chez le chien



Bland et Altman

On peut tout d'abord remarquer que les points représentés sur la Figure 19 ne forment pas de cône ouvert à gauche et fermé à droite. Par conséquent, les valeurs du biais et des limites d'agrément sont *a priori* interprétables. Les deux droites vertes indiquent que 95% des écarts relatifs entre les deux prélèvements sont compris entre -4,98 et + 5,48 à 30 secondes et entre -6,24 et +6,27 à 120 secondes. Le coefficient de répétabilité est de 5,23 à 30 secondes et de 6,26 à 120 secondes, ces deux valeurs sont supérieures à 3, l'écart fixé *a priori*. Ainsi, le critère de Bland et Altman n'étant pas vérifié, cette méthode n'est pas répétable.

Figure 19 : Graphique de Bland et Altman représentant la concordance des mesures entre le premier prélèvement et le second prélèvement par la première méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la répétabilité



Coefficient Kappa

La répartition des résultats à 30 secondes et à 120 secondes est récapitulée respectivement dans le Tableau 8 et le Tableau 9. Le coefficient Kappa à 30 secondes est de 0,64 avec un intervalle de confiance à 95% de [0,18 – 1,09]. La répétabilité à 30 secondes est donc considérée comme bonne par cette analyse statistique. A 120 secondes cependant, le coefficient Kappa est égal à 0,09 soit mauvais. L'un des deux Kappa n'étant pas correct, nous considérons que la répétabilité de la méthode 1 n'est pas satisfaisante.

Tableau 8 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 1 à 30 secondes

| | | Premier prélèvement | | total |
|-----------------------|---------------|---------------------|---|-------|
| Second prélèvement | Stress faible | Stress élevé | | |
| | Stress faible | 14 | 0 | 4 |
| | Stress élevé | 1 | 1 | 2 |
| Total | | 15 | 1 | 16 |

Tableau 9 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 1 à 120 secondes

| | | Premier prélèvement | | total |
|-----------------------|---------------|---------------------|---|-------|
| Second prélèvement | Stress faible | Stress élevé | | |
| | Stress faible | 14 | 0 | 14 |
| | Stress élevé | 1 | 1 | 2 |
| Total | | 15 | 1 | 16 |

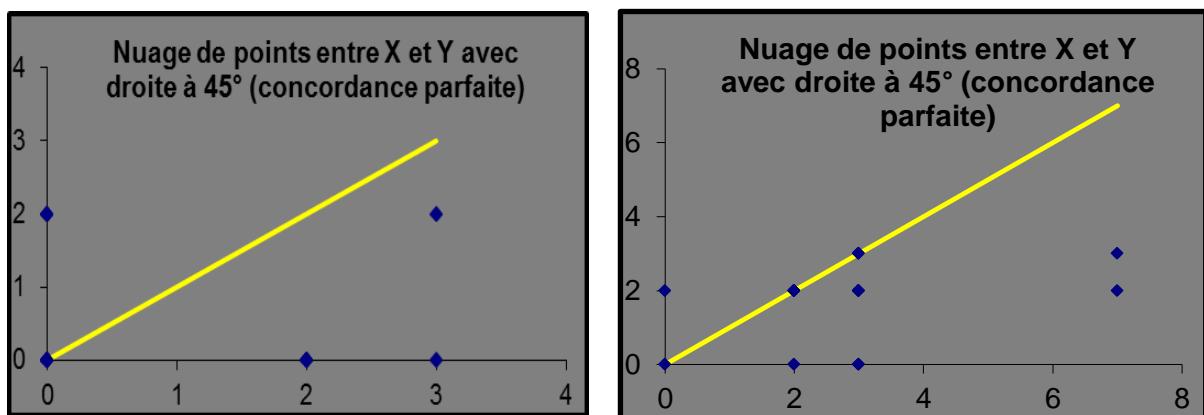
Ainsi, cette première méthode de prélèvement ne semble pas répétable quelle que soit la méthode statistique d'analyse de la concordance utilisée.

2.3.1.1.2. Méthode 2

Coefficient de Lin

Concernant la deuxième méthode qui consistait à diluer l'écouillon de salive dans 300 μ L de NaCl, le coefficient de Lin était de -0,05 à 30 secondes et de 0,24 à 120 secondes, soit inacceptable dans les deux cas. En effet nous pouvons voir sur la Figure 20 que plusieurs points sont très éloignés de la droite jaune correspondant à une concordance parfaite. Ainsi, d'après ce coefficient, la deuxième méthode de prélèvement n'est absolument pas répétable.

Figure 20 : Représentation graphique du coefficient de Lin pour la deuxième méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la répétabilité chez le chien

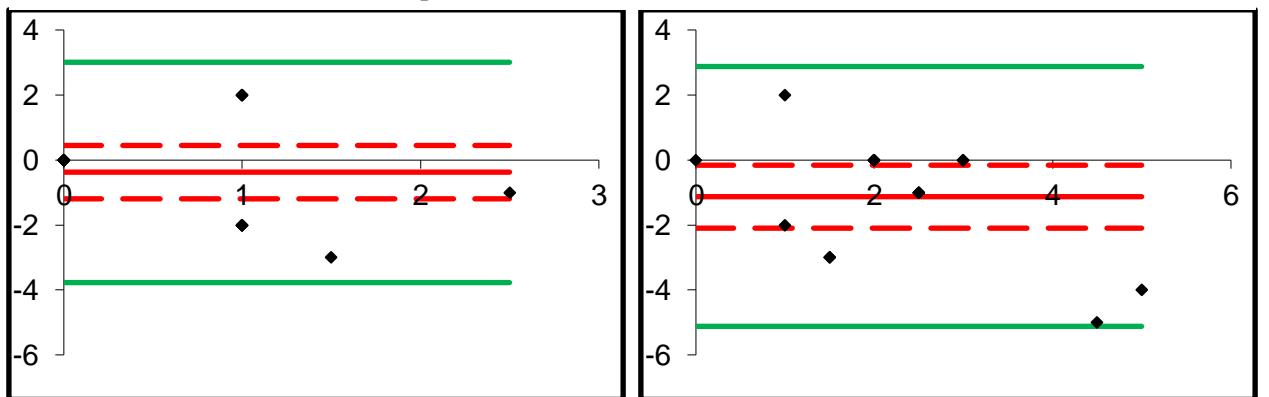


Bland et Altman

De nouveau, on peut remarquer que les points représentés sur la Figure 21 ne forment pas de cône ouvert à gauche et fermé à droite. Par conséquent, les valeurs des limites d'agrément sont *a priori* interprétables. Les deux droites vertes indiquent que 95% des écarts relatifs entre les deux prélèvements sont compris entre -3,77 et +3,02 à 30 secondes et entre -5,13 et +2,88 à 120 secondes. Le coefficient de répétabilité est de 3,40 à 30 secondes et de 4,0 à 120 secondes. Bien que plus proche de 3 que pour la première méthode de prélèvements, le critère fixé *a priori* n'est pas non plus vérifié.

Ainsi, d'après les deux analyses statistiques quantitatives, la méthode 2 n'est pas répétable.

Figure 21 : Graphique de Bland et Altman représentant la concordance des mesures entre le premier prélèvement et le second prélèvement par la deuxième méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la répétabilité chez le chien



Coefficient Kappa

La répartition des résultats à 30 secondes et à 120 secondes est récapitulée respectivement dans le Tableau 10 et le Tableau 11. Le coefficient Kappa à 30 secondes ne peut pas être calculé car la concordance aléatoire est égale à 1 et qu'il est impossible de diviser par 0. La répétabilité à 30 secondes ne peut donc pas être mesurée par cette analyse statistique. On peut penser que tous les prélèvements ayant donné le même résultat lors des deux prélèvements, la répétabilité à 30 secondes devrait être bonne, cependant, il est impossible de tenir compte de la part de hasard dans ce résultat. A 120 secondes cependant, le coefficient Kappa est égal à 0 soit mauvais. L'un des deux Kappa au moins (celui à 120 secondes) n'étant pas correct, nous considérons que la répétabilité de la méthode 2 n'est pas satisfaisante.

Tableau 10 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 2 à 30 secondes

| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|----|-------|
| Second prélèvement | Stress faible | Stress élevé | | |
| Stress faible | 16 | 0 | 16 | |
| Stress élevé | 0 | 0 | 0 | |
| Total | 16 | 0 | 16 | |

Tableau 11 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 2 à 120 secondes

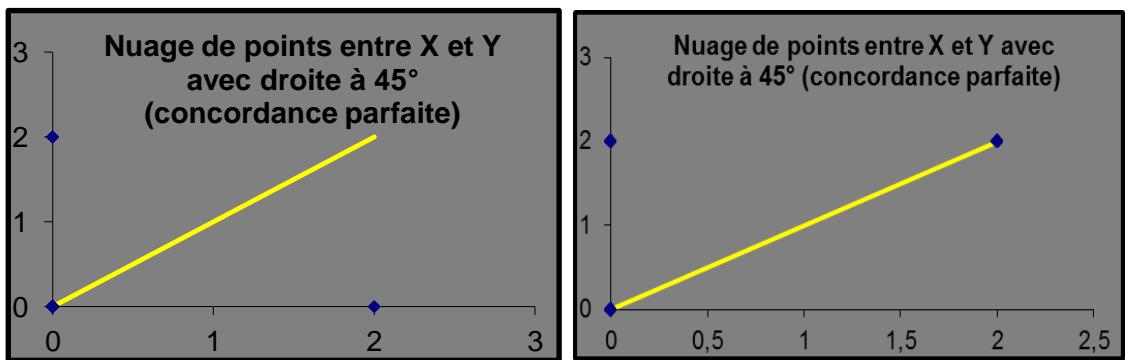
| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|--------------|-------|
| | | Stress faible | Stress élevé | |
| Second prélèvement | Stress faible | 14 | 2 | 16 |
| | Stress élevé | 0 | 0 | 0 |
| Total | | 14 | 2 | 16 |

2.3.1.1.3. Méthode 3

Coefficient de Lin

La troisième méthode consistait à diluer l'écouillon de salive dans 600 μ L de NaCl. Pour cette méthode, le coefficient de Lin était de -0,09 à 30 secondes ce qui correspond à une concordance inacceptable, et de 0,52 à 120 secondes ce qui correspond à une concordance mauvaise. Pour cette méthode, à 30 secondes, 13 animaux ont donné un résultat négatif (soit de valeur 0) lors des deux séries de mesures. De plus deux animaux ont donné un résultat négatif lors de la première série de mesures et un résultat à une croix lors de la deuxième série. Ainsi, trois prélèvements ont donné des résultats éloignés de la droite jaune. On peut en effet remarquer sur la Figure 22 que certains points sont très éloignés des droites jaunes sur les deux graphiques.

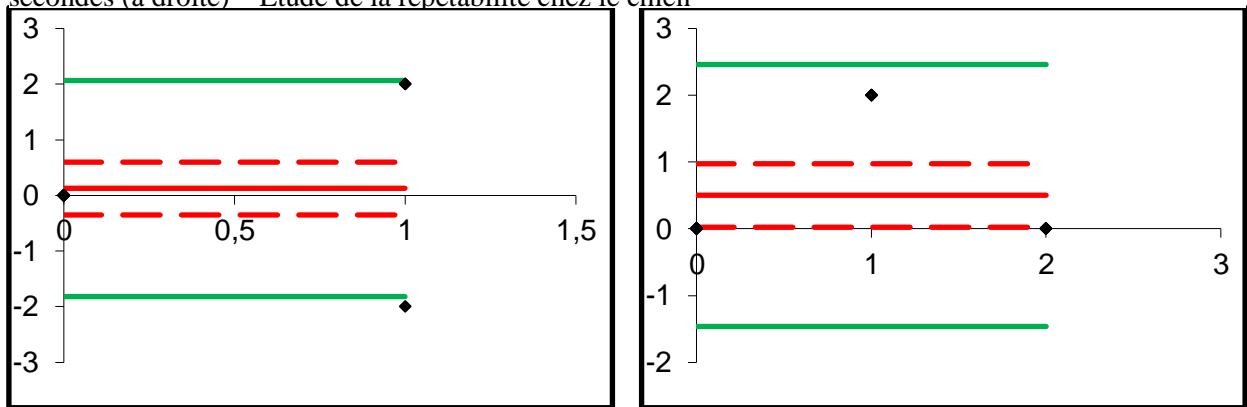
Figure 22 : Représentation graphique du coefficient de Lin pour la troisième méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la répétabilité chez le chien



Bland et Altman

Une fois encore, on peut remarquer que les points représentés sur la Figure 23 ne forment pas de cône ouvert à gauche et fermé à droite. Par conséquent, les valeurs des limites d'agrément sont a priori interprétables. Les deux droites vertes indiquent que 95% des écarts relatifs entre les deux prélèvements sont compris entre -1,82 et + 2,07 à 30 secondes et -1,47 et 2,47 à 120 secondes. Le coefficient de répétabilité est donc de 1,95 à 30 secondes et 1,98 à 120 secondes ce qui est inférieur à 3 dans les deux cas. Le critère concordance fixé a priori est donc respecté.

Figure 23 : Graphique de Bland et Altman représentant la concordance des mesures entre le premier prélèvement et le second prélèvement par la troisième méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la répétabilité chez le chien



Coefficient Kappa

La répartition des résultats à 30 secondes et à 120 secondes est récapitulée respectivement dans le Tableau 12 et le Tableau 13.

La division par 0 n'étant pas possible, le coefficient Kappa n'a pu être calculé pour cette méthode. La situation est la même que pour la méthode 2 à 30 secondes.

Tableau 12: Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 3 à 30 secondes

| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|--------------|-------|
| | | Stress faible | Stress élevé | |
| Second prélèvement | Stress faible | 16 | 0 | 16 |
| | Stress élevé | 0 | 0 | 0 |
| Total | | 16 | 0 | 16 |

Tableau 13 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 3 à 120 secondes

| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|--------------|-------|
| | | Stress faible | Stress élevé | |
| Second prélèvement | Stress faible | 16 | 0 | 16 |
| | Stress élevé | 0 | 0 | 0 |
| Total | | 16 | 0 | 16 |

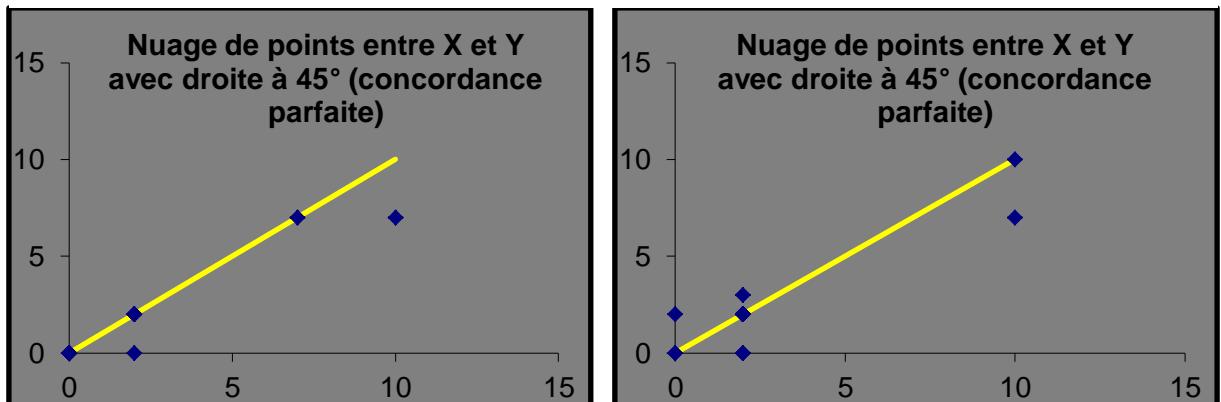
Il semble donc que cette méthode soit répétable de manière assez satisfaisante d'après Bland et Altman et du fait que tous les animaux étaient dans la catégorie « stress faible » lors des deux prélèvements. Cependant, il faut noter que 7 animaux sur 15 (46,7%) ayant réagi à 300µL de dilution n'ont pas déclenché de réaction à 600µL.

2.3.1.1.4. Méthode 4

Coefficient de Lin

La méthode 4 consistait à prélever la salive sur un écouvillon puis à l'appliquer sur la bandelette en roulant l'écouvillon. Pour cette méthode le coefficient de Lin était de 0,94 ce qui correspond à une répétabilité excellente à 30 secondes et de 0,91 ce qui correspond à une répétabilité très bonne à 120 secondes. En effet, on peut voir sur la Figure 24 que la majorité des points coïncident avec la droite à 45° de concordance parfaite.

Figure 24 : Représentation graphique du coefficient de Lin pour la quatrième méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la répétabilité chez le chien

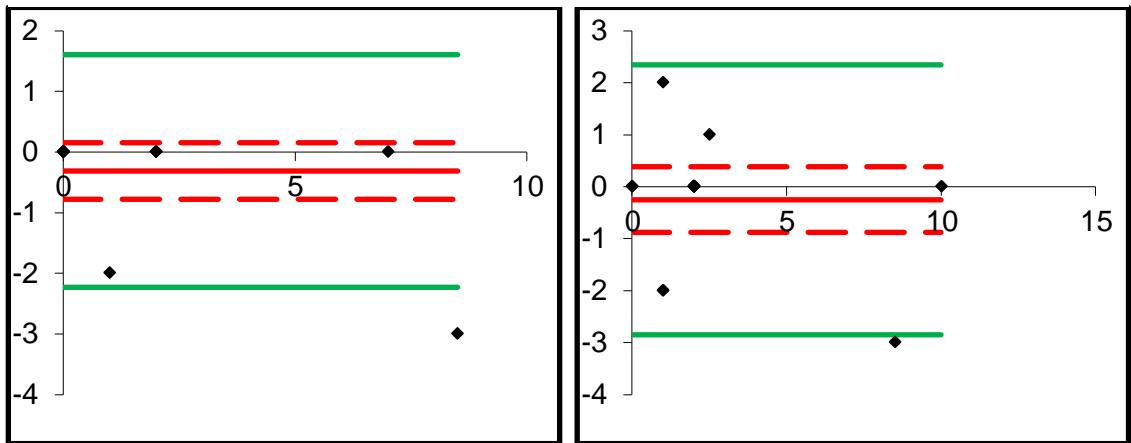


Bland et Altman

Là encore, les points représentés sur la Figure 25 ne forment pas de cône ouvert à gauche et fermé à droite. Par conséquent, les valeurs des limites d'agrément sont *a priori* interprétables. Les deux droites vertes indiquent que 95% des écarts relatifs entre les deux prélèvements sont compris entre -2,23 et +1,61 à 30 secondes et -2,85 et +2,35 à 120 secondes. Le coefficient de répétabilité est donc de 1,92 à 30 secondes et 2,6 à 120 secondes ce qui est inférieur à 3 dans les deux cas. Le critère concordance fixé *a priori* est donc respecté.

Ainsi, d'après l'analyse statistique quantitative, la méthode 4 semble répétable de façon très satisfaisante.

Figure 25 : Graphique de Bland et Altman représentant la concordance des mesures entre le premier prélèvement et le second prélèvement par la quatrième méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la répétabilité chez le chien



Coefficient Kappa

La répartition des résultats à 30 secondes et à 120 secondes est récapitulée respectivement dans le Tableau 14 et le Tableau 15. Le coefficient Kappa est de 1 soit « très bon » à 30 secondes et à 120 secondes.

Tableau 14 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 4 à 30 secondes

| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|--------------|-------|
| | | Stress faible | Stress élevé | |
| Second prélèvement | Stress faible | 14 | 1 | 15 |
| | Stress élevé | 1 | 0 | 1 |
| Total | | 15 | 0 | 16 |

Tableau 15 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 4 à 120 secondes

| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|--------------|-------|
| | | Stress faible | Stress élevé | |
| Second prélèvement | Stress faible | 14 | 0 | 14 |
| | Stress élevé | 0 | 2 | 2 |
| Total | | 14 | 2 | 16 |

Ainsi, selon cette analyse la méthode 4 est également tout à fait répétable.

2.3.1.1.5. Bilan sur la répétabilité

Tableau 16 : Répétabilité de chaque méthode selon l'analyse statistique chez le chien

| | Méthode 1 | Méthode 2 | Méthode 3 | Méthode 4 |
|------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Lin | Mauvaise | Mauvaise | Non calculable | Très bonne |
| Bland et Altman | Mauvaise | Mauvaise | Bonne | Très bonne |
| Kappa | Mauvaise | Mauvaise | Non calculable | Très bonne |

Le Tableau 16 montre qu'une seule des quatre méthodes semble répétable statistiquement, la méthode 4 consistant à prélever de la salive sur un écouvillon et à l'étaler sur la bandelette en roulant l'écouvillon. Les méthodes une et deux ne sont pas répétables et la méthode trois a été éliminée car la trop grande dilution risquait de masquer des animaux dont le stress oxydatif est élevé, soit d'avoir trop de résultats faussement négatifs.

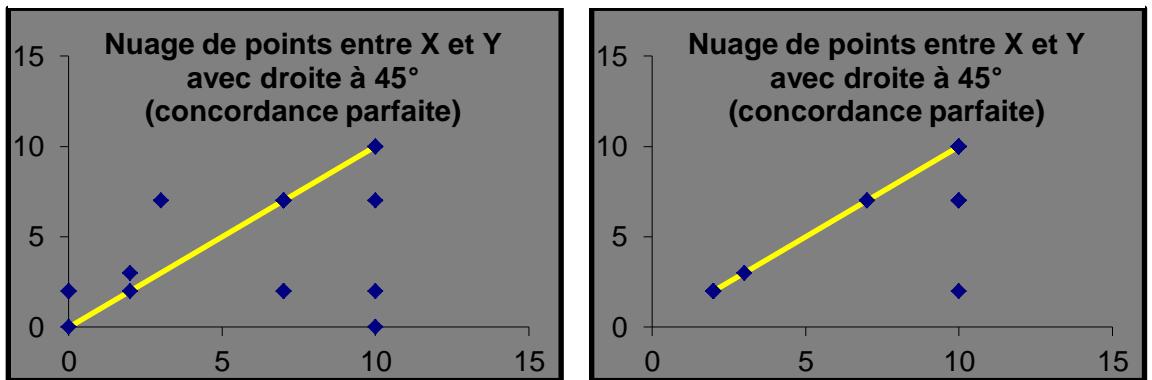
Compte tenu de ces résultats, la reproductibilité n'a été évaluée que sur la méthode 4. En effet, calculer la reproductibilité d'une méthode qui n'est déjà pas répétable serait un non-sens.

2.3.1.2. Reproductibilité

Coefficient de Lin

Le coefficient de Lin est de 0,46 soit inacceptable à 30 secondes et de 0,78 soit moyennement satisfaisant à deux minutes. En effet, la Figure 26 montre - en particulier à 30 secondes - que de nombreux points sont éloignés de la droite de concordance parfaite. Ainsi d'après le coefficient de Lin, cette méthode est peu reproductible dans le temps.

Figure 26 : Représentation graphique du coefficient de Lin pour la quatrième méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la reproductibilité chez le chien

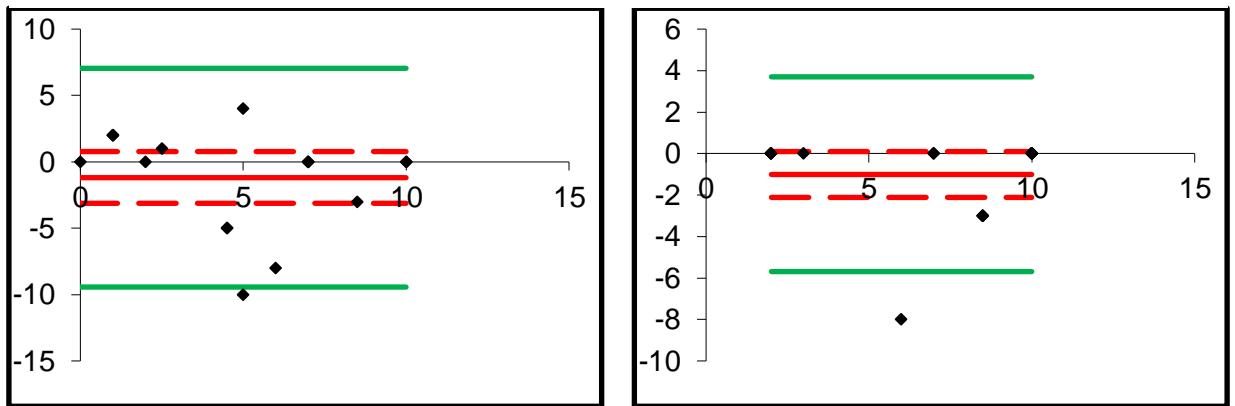


Bland et Altman

Nous considérons que la méthode de mesure est reproductible si en moyenne, la deuxième série de mesures ne surestime ou ne sous-estime pas les valeurs par rapport à la première série de mesure de plus de 3, et si la très grande majorité des écarts (en valeur absolue) entre les deux séries de mesures est inférieure à 3. Sur la Figure 27, la droite rouge représente le biais, c'est-à-dire la moyenne des écarts de mesures entre les deux séries de prélèvements. Ici, la valeur de ce biais est -1,18 à 30 secondes et -1 à 120 secondes, ce qui est inférieur à 3 dans les deux cas. L'intervalle de confiance à 95% de ce biais est fourni, et vaut [-3,12 ; +0,77] à 30 secondes et [-2,11 ; +0,11] à 120 secondes. Cet intervalle de confiance à 95% comprend la valeur « 0 », donc il n'y a pas de surestimation ou de sous-estimation significative entre les deux séries de prélèvements. Le premier critère de Bland et Altman est donc respecté. Les deux droites vertes indiquent que 95% des écarts relatifs entre les deux prélèvements sont compris entre -9,42 et +7,07 à 30 secondes et -5,69 et +3,69 à 120 secondes. Le coefficient de répétabilité est donc de 8.25 à 30 secondes et 4.69 à 120 secondes ce qui est supérieur à 3 dans les deux cas. Le second critère de Bland et Altman n'est pas respecté.

L'un des deux critères n'étant pas respecté et la méthode de Bland et Altman coïncidant avec le coefficient de Lin, la méthode consistant à prélever de la salive sur un écouvillon et à l'étaler sur la bandelette ensuite ne semble pas reproductible dans le temps.

Figure 27 : Graphique de Bland et Altman représentant la concordance des mesures entre le premier prélèvement et le second prélèvement par la quatrième méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la reproductibilité chez le chien



Coefficient Kappa

Le coefficient Kappa à 30 secondes est de 0,43 ce qui correspond à une concordance moyenne. Il est de 0,87 à 120 secondes, ce qui correspond à une concordance très bonne. Ainsi, si l'on choisit de regrouper les animaux par classes en fonction de leurs résultats, la reproductibilité dans le temps de la méthode semble meilleure sans être satisfaisante pour autant.

La répartition des résultats à 30 secondes et à 120 secondes est récapitulée respectivement dans le Tableau 17 et le Tableau 18.

Tableau 17 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 4 à 30 secondes

| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|----|-------|
| Second prélèvement | Stress faible | Stress élevé | | |
| Stress faible | 14 | 1 | 15 | |
| Stress élevé | 1 | 0 | 1 | |
| Total | 15 | 0 | 16 | |

Tableau 18 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 4 à 120 secondes

| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|--------------|-------|
| | | Stress faible | Stress élevé | |
| Second prélèvement | Stress faible | 14 | 1 | 15 |
| | Stress élevé | 1 | 0 | 1 |
| Total | | 15 | 0 | 16 |

Bilan sur la reproductibilité de la méthode 4 chez le chien (Tableau 19)

Seule l'analyse du coefficient Kappa permet de conclure à une bonne reproductibilité de cette méthode chez le chien.

Tableau 19 : Bilan sur la reproductibilité de la méthode 4 chez le chien

| Méthode statistique | Reproductibilité |
|---------------------|------------------|
| Lin | Mauvaise |
| Bland et Altman | Mauvaise |
| Kappa | Bonne |

2.3.2. Chez le cheval

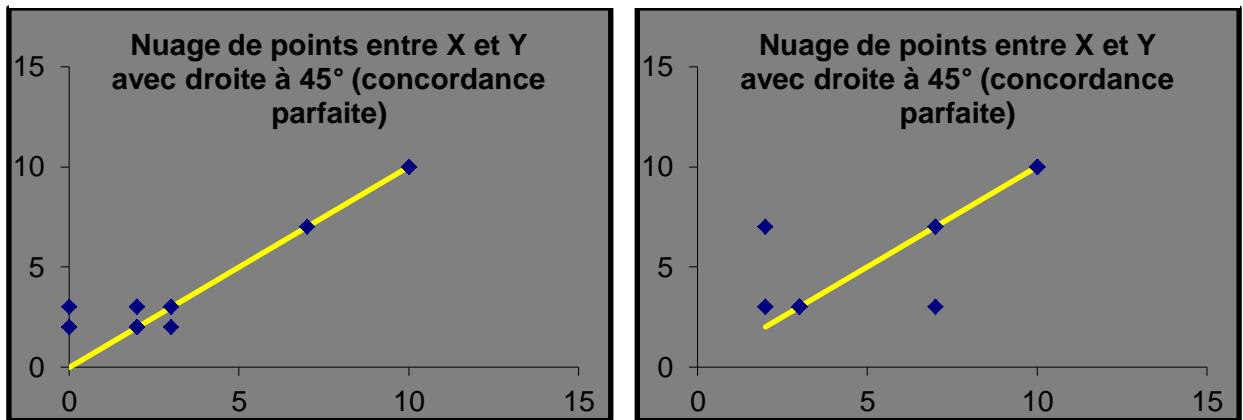
2.3.2.1. Répétabilité

2.3.2.1.1. Méthode 1

Coefficient de Lin

Pour la comparaison des deux séries de mesure, le coefficient de Lin selon la première méthode de prélèvement chez le cheval était de 0,93, soit très bon à 30 secondes et de 0,86, soit plutôt bon à 120 secondes. La droite jaune de la Figure 28 représente la ligne sur laquelle devraient se trouver les points en cas de concordance parfaite. On peut remarquer qu'à 30 secondes, la majorité des points représentant les animaux prélevés sont proches ou sur cette droite, ce qui justifie la très bonne concordance. A 120 secondes, deux points sont plus éloignés de la droite que les autres ce qui est corrélé à un coefficient de Lin inférieur. Compte tenu des deux coefficients de Lin, on considère que la répétabilité de la méthode une chez le cheval est plutôt bonne.

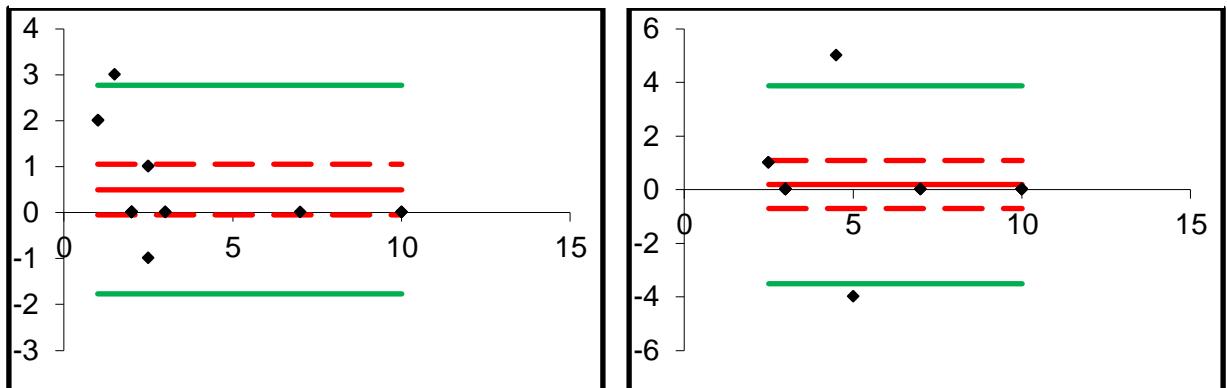
Figure 28 : Représentation graphique du coefficient de Lin pour la première méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la répétabilité chez le cheval



Bland et Altman

On peut tout d'abord remarquer que les points représentés sur la Figure 29 ne forment pas de cône ouvert à gauche et fermé à droite. Par conséquent, les valeurs du biais et des limites d'agrément sont a priori interprétables. Les deux droites vertes indiquent que 95% des écarts relatifs entre les deux prélèvements sont compris entre -1,77 et + 2,77 à 30 secondes et entre -3,51 et +3,88 à 120 secondes. Le coefficient de répétabilité est de 2,27 à 30 secondes et de 3,70 à 120 secondes. Bien que cette valeur soit inférieure à 3 à 30 secondes, elle est supérieure à 3 à 120 secondes, l'écart fixé a priori. Ainsi, le critère de Bland et Altman n'étant pas vérifié à 120 secondes, cette méthode n'est pas répétable.

Figure 29 : Graphique de Bland et Altman représentant la concordance des mesures entre le premier prélèvement et le second prélèvement par la première méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la répétabilité chez le cheval



Coefficient Kappa

La répartition des résultats à 30 secondes après regroupement en deux catégories est représentée dans le Tableau 20 et dans le Tableau 21 pour les résultats à 120 secondes.

Le coefficient Kappa à 30 secondes est de 1 ce qui correspond à une concordance très bonne et de 0,75 à 120 secondes, ce qui correspond à une bonne concordance. Ainsi, si l'on regroupe les résultats en deux catégories et que l'on utilise cette méthode statistique, la répétabilité de la première méthode chez le cheval peut être considérée comme bonne.

Tableau 20 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 1 à 30 secondes – Etude de la répétabilité chez le cheval

| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|---|-------|
| Second prélèvement | Stress faible | Stress élevé | | |
| | Stress faible | 13 | 0 | 13 |
| | Stress élevé | 0 | 3 | 3 |
| Total | | 13 | 3 | 16 |

Tableau 21 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 1 à 120 secondes – Etude de la répétabilité chez le cheval

| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|---|-------|
| Second prélèvement | Stress faible | Stress élevé | | |
| | Stress faible | 8 | 1 | 9 |
| | Stress élevé | 1 | 6 | 7 |
| Total | | 9 | 7 | 16 |

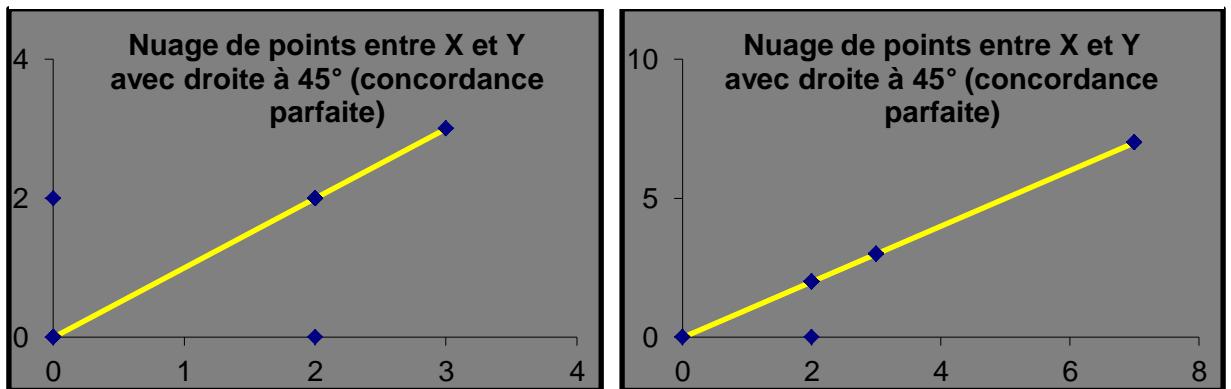
2.3.2.1.2. Méthode 2

Coefficient de Lin

Pour la comparaison deux séries de mesure selon la deuxième méthode de prélèvement chez le cheval, le coefficient de Lin était de 0,8 soit très bon à 30 secondes et de 0,98 soit excellent à 120 secondes. La droite jaune de la Figure 30 représente la ligne sur laquelle devraient se trouver les points en cas de concordance parfaite. On peut remarquer qu'à 30

secondes, seuls deux points sont légèrement éloignés de la droite ce qui justifie le très bon coefficient de Lin. A 12 secondes, seul un point n'est pas sur cette droite ce qui est corrélé à un excellent coefficient de Lin. Compte tenu des deux coefficients de Lin, on considère que la répétabilité de la deuxième méthode chez le cheval est très bonne.

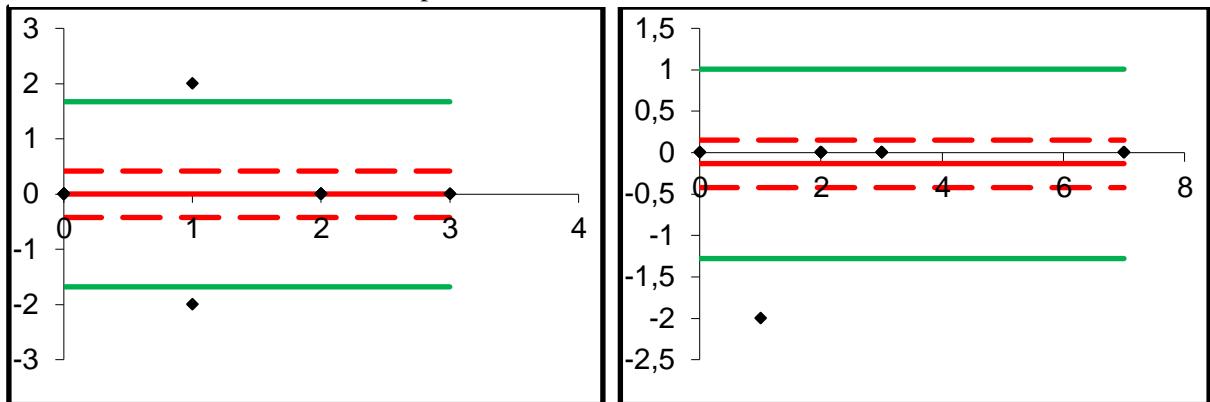
Figure 30 : Représentation graphique du coefficient de Lin pour la deuxième méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la répétabilité chez le cheval



Bland et Altman

Comme précédemment, nous pouvons remarquer que les points représentés sur la Figure 31 ne forment pas de cône ouvert à gauche et fermé à droite. Par conséquent, les valeurs du biais et des limites d'agrément sont *a priori* interprétables. Les deux droites vertes indiquent que 95% des écarts relatifs entre les deux prélèvements sont compris entre -1,67 et +1,67 à 30 secondes et entre -1,28 et +1,01 à 120 secondes. Le coefficient de répétabilité est de 1,67 à 30 secondes et de 1,14 à 120 secondes. Cette valeur est inférieure à 3 à 30 secondes et à 120 secondes, l'écart fixé *a priori*. Ainsi, le critère de Bland et Altman est vérifié à 30 secondes et à 120 secondes, la deuxième méthode est donc répétable.

Figure 31 : Graphique de Bland et Altman représentant la concordance des mesures entre le premier prélèvement et le second prélèvement par la deuxième méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la répétabilité chez le cheval



Coefficient Kappa

La répartition des résultats à 30 secondes et à 120 secondes après regroupement en deux catégories est représentée respectivement dans le Tableau 22 et le Tableau 23.

Le coefficient Kappa à 30 secondes n'est pas calculable car tous les prélèvements donnaient un résultat correspondant à un « stress faible » et que le calcul nécessite une division par 0 ce qui est impossible. Le coefficient Kappa est de 1 à 120 secondes, ce qui correspond à une concordance très bonne. Ainsi, le coefficient ne pouvant être calculé à 30 secondes, la répétabilité de la deuxième méthode ne peut être évaluée par cette approche statistique. Cependant, tous les résultats étant identiques à 30 secondes et le coefficient étant très bon à 10 secondes, on peut penser que la deuxième méthode est répétable.

Tableau 22 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 2 à 30 secondes – Etude de la répétabilité chez le cheval

| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|----|-------|
| Second prélèvement | Stress faible | Stress élevé | | |
| Stress faible | 15 | 0 | 15 | |
| Stress élevé | 0 | 0 | 0 | |
| Total | 15 | 0 | 15 | |

Tableau 23 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 2 à 120 secondes – Etude de la répétabilité chez le cheval

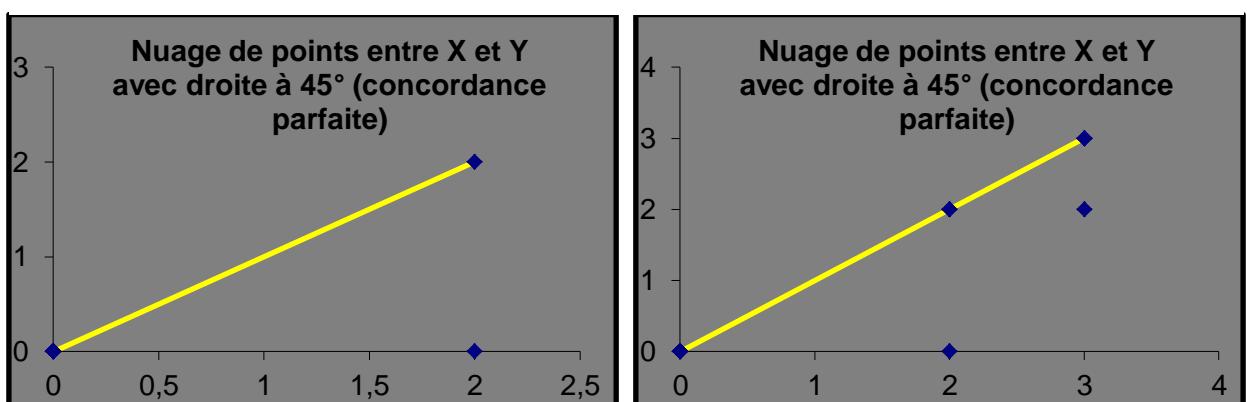
| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|--------------|-------|
| | | Stress faible | Stress élevé | |
| Second prélèvement | Stress faible | 12 | 0 | 12 |
| | Stress élevé | 0 | 3 | 3 |
| Total | | 12 | 3 | 15 |

2.3.2.1.3. Méthode 3

Coefficient de Lin

Pour la comparaison des deux séries de mesure selon la troisième méthode de prélèvement, le coefficient de Lin chez le cheval était de 0,63 soit passable à 30 secondes et de 0,9 soit plutôt bon à 120 secondes. On peut remarquer sur la Figure 32 qu'à 30 secondes, un point sur trois est plutôt loin de la droite ce qui justifie le coefficient de Lin comme passable. A 120 secondes, seul un point sur cinq est autant éloigné ce qui justifie que le coefficient de Lin soit meilleur. Compte tenu des deux coefficients de Lin, on considère que la répétabilité de la troisième méthode chez le cheval est moyenne.

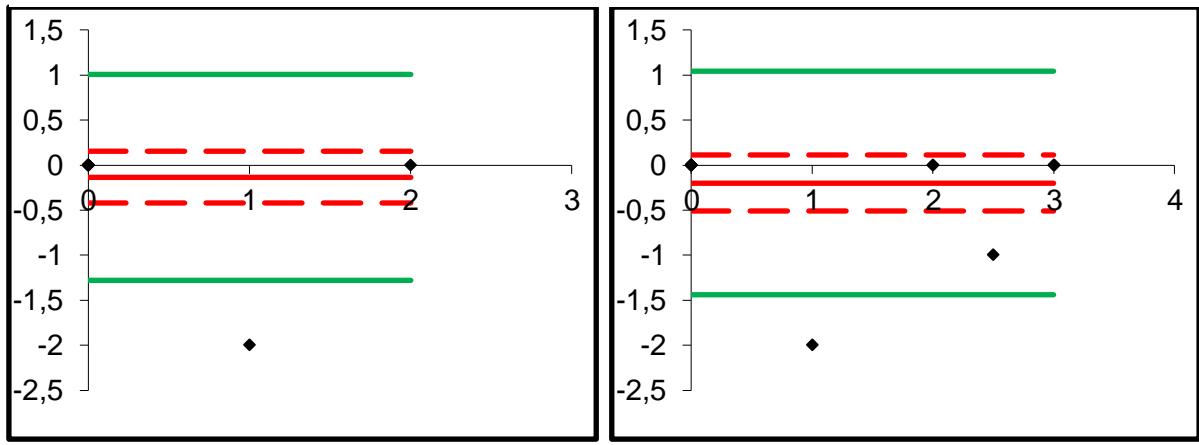
Figure 32 : Représentation graphique du coefficient de Lin pour la troisième méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la répétabilité chez le cheval



Bland et Altman

Comme précédemment, on peut remarquer que les points représentés sur la Figure 33 ne forment pas de cône ouvert à gauche et fermé à droite. Par conséquent, les valeurs du biais et des limites d'agrément sont *a priori* interprétables. Les deux droites vertes indiquent que 95% des écarts relatifs entre les deux prélèvements sont compris entre -1,28 et +1,01 à 30 secondes et entre -1,44 et +1,04 à 120 secondes. Le coefficient de répétabilité est de 1,15 à 30 secondes et de 1,24 à 120 secondes. Cette valeur est inférieure à 3 à 30 secondes et à 120 secondes, l'écart fixé *a priori*. Ainsi, le critère de Bland et Altman est vérifié à 30 secondes et à 120 secondes, la troisième méthode est donc répétable selon cette approche statistique.

Figure 33 : Graphique de Bland et Altman représentant la concordance des mesures entre le premier prélèvement et le second prélèvement par la troisième méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la répétabilité chez le cheval



Coefficient Kappa

La répartition des résultats à 30 secondes et à 120 secondes après regroupement en deux catégories est représentée respectivement dans le Tableau 24 et le Tableau 25.

Le coefficient Kappa n'est pas calculable, aussi bien à 30 secondes qu'à 120 secondes. Ainsi la répétabilité de la troisième méthode n'est pas évaluable avec cette approche statistique.

Tableau 24 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 3 à 30 secondes – Etude de la répétabilité chez le cheval

| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|---|-------|
| Second prélèvement | Stress faible | Stress élevé | | |
| | Stress faible | 15 | 0 | 15 |
| | Stress élevé | 0 | 0 | 0 |
| Total | | 15 | 0 | 15 |

Tableau 25 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 3 à 120 secondes – Etude de la répétabilité chez le cheval

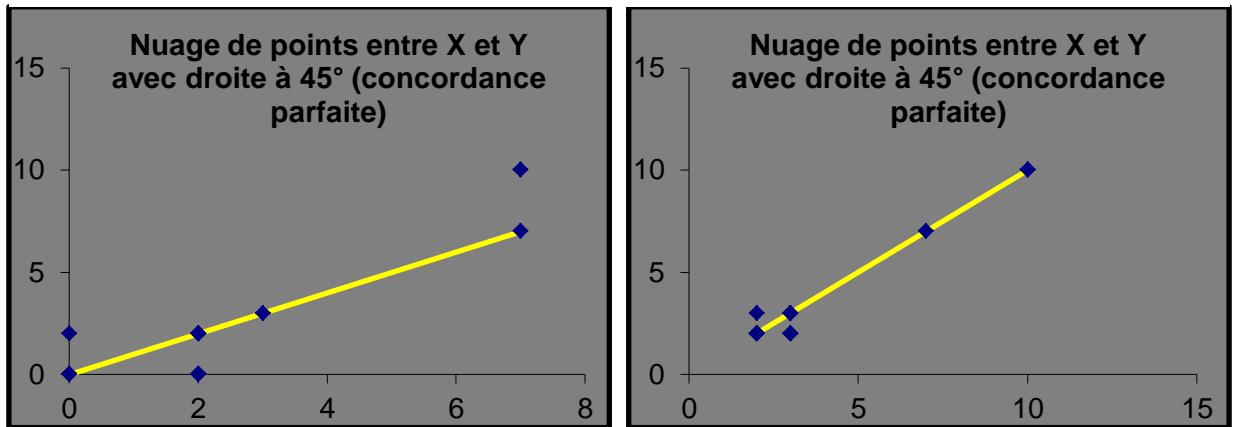
| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|---|-------|
| Second prélèvement | Stress faible | Stress élevé | | |
| | Stress faible | 15 | 0 | 15 |
| | Stress élevé | 0 | 0 | 0 |
| Total | | 15 | 0 | 15 |

2.3.2.1.4. Méthode 4

Coefficient de Lin

Pour la comparaison des deux séries de mesure selon la quatrième méthode de prélèvement, le coefficient de Lin chez le cheval était de 0,84 soit plutôt bon à 30 secondes et de 0,98 soit excellent à 120 secondes. En effet, on peut remarquer sur la Figure 34 qu'à 30 secondes et à 120 secondes, la majorité des points représentant les animaux prélevés sont proches ou sur cette droite, ce qui justifie la très bonne concordance. Compte tenu des deux coefficients de Lin, on considère que la répétabilité de la méthode quatre chez le cheval est très bonne.

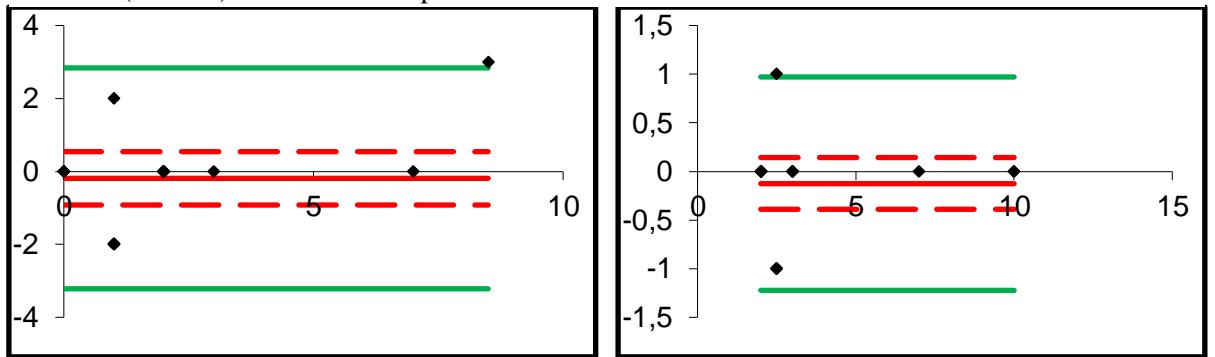
Figure 34 : Représentation graphique du coefficient de Lin pour la quatrième méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la répétabilité chez le cheval



Bland et Altman

On peut tout d'abord remarquer que les points représentés sur la Figure 35 ne forment pas de cône ouvert à gauche et fermé à droite. Par conséquent, les valeurs du biais et des limites d'agrément sont *a priori* interprétables. Les deux droites vertes indiquent que 95% des écarts relatifs entre les deux prélèvements sont compris entre -3,21 et +2,84 à 30 secondes et entre -1,22 et +0,97 à 120 secondes. Le coefficient de répétabilité est de 3,03 à 30 secondes et de 1,10 à 120 secondes. Ce coefficient est donc supérieur à 3 même s'il en est très proche à 30 secondes. Ainsi, le critère de Bland et Altman n'étant pas vérifié à 30 secondes, cette méthode n'est pas répétable.

Figure 35 : Graphique de Bland et Altman représentant la concordance des mesures entre le premier prélèvement et le second prélèvement par la quatrième méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la répétabilité chez le cheval



Coefficient Kappa

Le coefficient Kappa est de 1 à 30 secondes et à 120 secondes soit très bon. Ainsi, contrairement aux méthodes de Lin et de Bland et Altman, d'après le coefficient Kappa, cette méthode est répétable chez le cheval. Les résultats des prélèvements à 30 et à 120 secondes sont regroupés respectivement dans le Tableau 26 et le Tableau 27.

Tableau 26 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 4 à 30 secondes – Etude de la répétabilité chez le cheval

| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|---|-------|
| Second prélèvement | Stress faible | Stress élevé | | |
| | Stress faible | 14 | 0 | 14 |
| | Stress élevé | 0 | 2 | 2 |
| Total | | 14 | 2 | 16 |

Tableau 27 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 4 à 120 secondes – Etude de la répétabilité chez le cheval

| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|---|-------|
| Second prélèvement | Stress faible | Stress élevé | | |
| | Stress faible | 13 | 0 | 13 |
| | Stress élevé | 0 | 3 | 3 |
| Total | | 13 | 3 | 16 |

2.3.2.1.5. Bilan sur la répétabilité

Tableau 28 : Répétabilité de chaque méthode selon l'approche statistique choisie chez le cheval

| | Méthode 1 | Méthode 2 | Méthode 3 | Méthode 4 |
|------------------------|-----------|---------------|---------------|------------|
| Lin | Bonne | Très bonne | Moyenne | Très bonne |
| Bland et Altman | Mauvaise | Bonne | Bonne | Mauvaise |
| Kappa | Bonne | Non évaluable | Non évaluable | Bonne |

Chez le cheval les quatre méthodes donnent des résultats positifs quant à la répétabilité de l'analyse (Tableau 28). Ainsi, la reproductibilité a été calculée pour chacune des quatre méthodes.

2.3.2.2. Reproductibilité

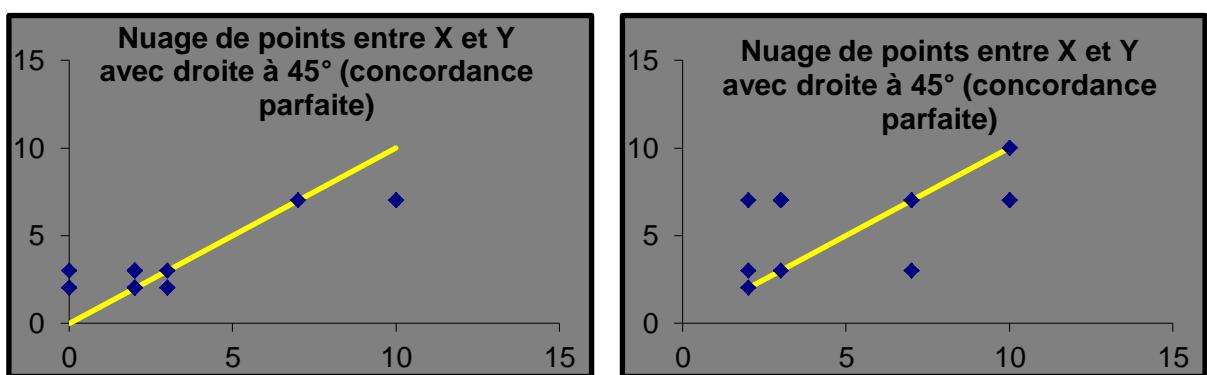
2.3.2.2.1. Méthode 1

Coefficient de Lin

Concernant la reproductibilité de la première méthode, le coefficient de Lin était de 0,79 à 30 secondes soit moyennement satisfaisant et de 0,46 à 120 secondes soit inacceptable. On peut en effet observer sur la Figure 36 que de nombreux points à 120 secondes sont très éloignés de la droite jaune correspondant à la droite de concordance parfaite.

Ainsi, d'après le coefficient de Lin, cette méthode n'est pas reproductible.

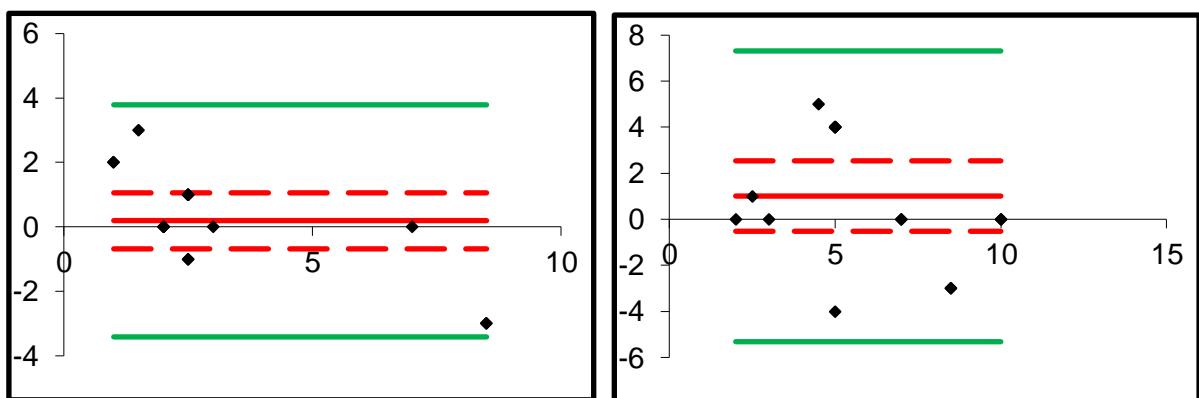
Figure 36 : Représentation graphique du coefficient de Lin pour la première méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la reproductibilité chez le cheval



Bland et Altman

On peut tout d'abord remarquer que les points représentés sur la Figure 37 ne forment pas de cône ouvert à gauche et fermé à droite. Par conséquent, les valeurs du biais et des limites d'agrément sont *a priori* interprétables. Les deux droites vertes indiquent que 95% des écarts relatifs entre les deux prélèvements sont compris entre -3,42 et +3,79 à 30 secondes et entre -5,32 et +7,32 à 120 secondes. Le coefficient de répétabilité est donc de 3,61 à 30 secondes et de 6,32 à 120 secondes. Ce coefficient est donc supérieur à 3, limite fixée *a priori*, aussi bien à 30 secondes qu'à 120 secondes. Ainsi, le critère de Bland et Altman n'étant pas vérifié, cette méthode n'est pas reproductible.

Figure 37 : Graphique de Bland et Altman représentant la concordance des mesures entre le premier prélèvement et le second prélèvement par la première méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la reproductibilité chez le cheval



Coefficient Kappa

Le coefficient Kappa pour la première méthode est de 1 à 30 secondes soit très bon et de 0,18, soit mauvais à 120 secondes. Ainsi, la première méthode n'est pas reproductible quelle que soit l'analyse statistique utilisée. Les résultats à 30 secondes et à 120 secondes sont regroupés respectivement dans le Tableau 29 et le Tableau 30.

Tableau 29: Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 1 à 30 secondes – Etude de la reproductibilité chez le cheval

| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|----|-------|
| Second prélèvement | Stress faible | Stress élevé | | |
| Stress faible | 13 | 0 | 13 | |
| Total | 13 | 3 | 16 | |

Tableau 30 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 1 à 120 secondes – Etude de la reproductibilité chez le cheval

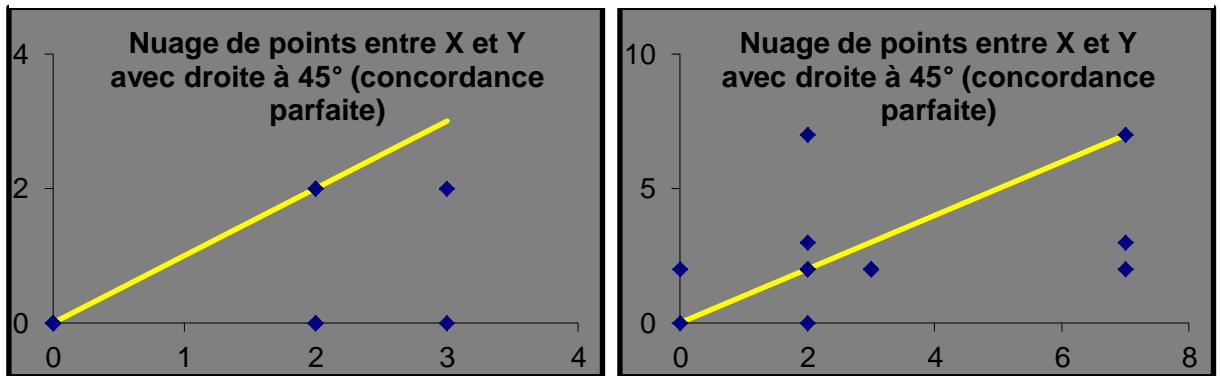
| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|----|-------|
| Second prélèvement | Stress faible | Stress élevé | | |
| Stress faible | 3 | 1 | 4 | |
| Total | 9 | 7 | 16 | |

2.3.2.2.2. Méthode 2

Coefficient de Lin

Concernant la reproductibilité de la première méthode, le coefficient de Lin était de 0,35 à 30 secondes soit et de 0,4 à 120 secondes soit inacceptable dans les deux cas. On peut en effet observer sur la Figure 38 que de nombreux points sont très éloignés de la droite jaune correspondant à la droite de concordance parfaite aussi bien à 30 secondes qu'à 120 secondes. Ainsi, la deuxième méthode n'est pas reproductible chez le cheval d'après le coefficient de Lin.

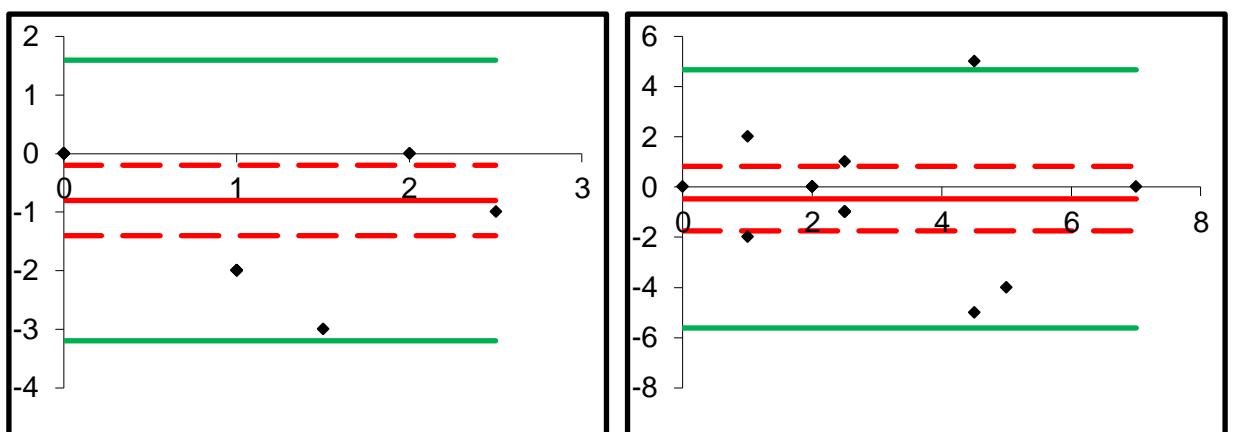
Figure 38: Représentation graphique du coefficient de Lin pour la deuxième méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la reproductibilité chez le cheval



Bland et Altman

Les points représentés sur la Figure 39 ne forment pas de cône ouvert à gauche et fermé à droite. Par conséquent, les valeurs du biais et des limites d'agrément sont *a priori* interprétables. Les deux droites vertes indiquent que 95% des écarts relatifs entre les deux prélèvements sont compris entre -3,2 et +1,6 à 30 secondes et entre -5,62 et +4,69 à 120 secondes. Le coefficient de répétabilité est donc de 2,4 à 30 secondes et de 5,16 à 120 secondes. Bien que ce coefficient soit inférieur à 3, limite fixée *a priori*, à 30 secondes, il est supérieur à 3 à 120 secondes. Ainsi, le critère de Bland et Altman n'étant pas vérifié à 120 secondes, cette méthode n'est pas reproductible.

Figure 39 : Graphique de Bland et Altman représentant la concordance des mesures entre le premier prélèvement et le second prélèvement par la deuxième méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la reproductibilité chez le cheval



Coefficient Kappa

Le Tableau 31 et le Tableau 32 regroupent respectivement les résultats à 30 secondes et à 120 secondes.

Le coefficient Kappa pour la deuxième méthode est de 0,29 soit passable à 120 secondes mais ne peut être calculé à 30 secondes étant donné la répartition des résultats. De ce fait, la reproductibilité de la deuxième méthode ne peut être évaluée par cette méthode statistique.

Tableau 31 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 2 à 30 secondes – Etude de la reproductibilité chez le cheval

| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|---|-------|
| Second prélèvement | Stress faible | Stress élevé | | |
| | Stress faible | 15 | 0 | 15 |
| | Stress élevé | 0 | 0 | 0 |
| Total | | 15 | 0 | 15 |

Tableau 32 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 2 à 120 secondes – Etude de la reproductibilité chez le cheval

| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|---|-------|
| Second prélèvement | Stress faible | Stress élevé | | |
| | Stress faible | 11 | 2 | 13 |
| | Stress élevé | 1 | 1 | 2 |
| Total | | 12 | 3 | 15 |

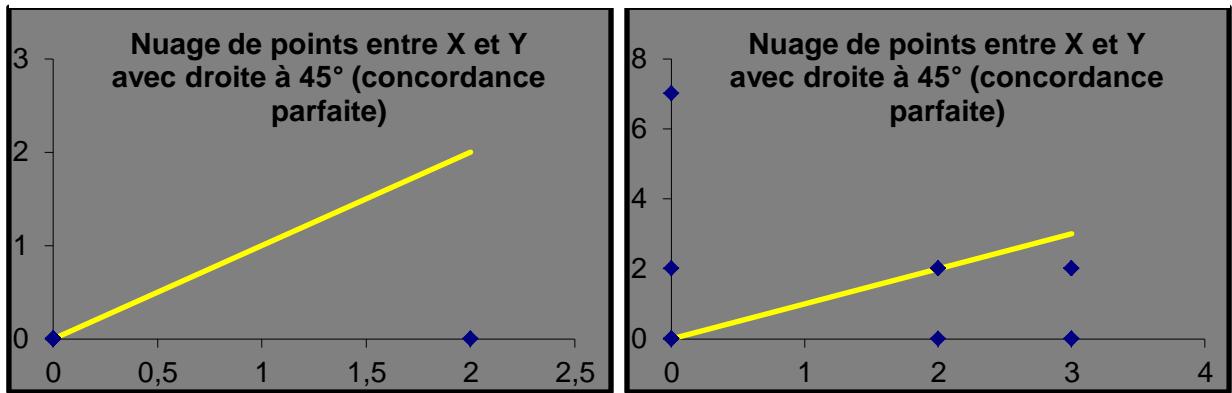
2.3.2.2.3. Méthode 3

Coefficient de Lin

Concernant la troisième méthode consistant à prélever la salive sur un écouvillon puis à la diluer dans 300µL avant de plonger la bandelette dans cette dilution, le coefficient de Lin à 30 secondes ne peut être calculé car le calcul nécessite une division par 0 (tous les prélèvements étant à 0 à 30 secondes) ce qui est impossible. De plus le coefficient de Lin à 120 secondes est de -0,01 soit inacceptable. La Figure 40 montre que plusieurs points sont très éloignés de la droite de concordance parfaite (droite jaune). Ainsi, même si le

coefficient pouvait être calculé à 30 secondes, cette méthode ne serait pas reproductible étant donné le résultat du coefficient à 120 secondes.

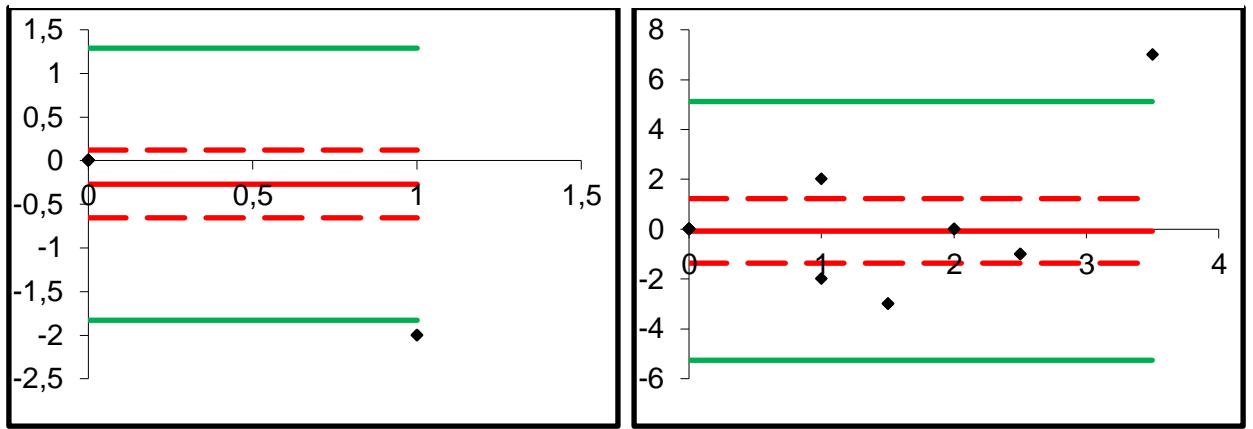
Figure 40 : Représentation graphique du coefficient de Lin pour la troisième méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la reproductibilité chez le cheval



Bland et Altman

Les points représentés sur la Figure 41 ne forment pas de cône ouvert à gauche et fermé à droite. Par conséquent, les valeurs du biais et des limites d'agrément sont *a priori* interprétables. Les deux droites vertes indiquent que 95% des écarts relatifs entre les deux prélèvements sont compris entre -1,83 et +1,29 à 30 secondes et entre -5,26 et +5,13 à 120 secondes. Le coefficient de répétabilité est donc de 1,56 à 30 secondes et de 5,20 à 120 secondes. Bien que ce coefficient soit inférieur à 3, limite fixée *a priori*, à 30 secondes, il est supérieur à 3 à 120 secondes. Ainsi, le critère de Bland et Altman n'étant pas vérifié à 120 secondes, la troisième méthode n'est pas reproductible.

Figure 41 : Graphique de Bland et Altman représentant la concordance des mesures entre le premier prélèvement et le second prélèvement par la troisième méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la reproductibilité chez le cheval



Coefficient Kappa

Le Tableau 33 et le Tableau 34 regroupent respectivement les résultats des prélèvements à 30 secondes et à 120 secondes.

Tableau 33 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 3 à 30 secondes – Etude de la reproductibilité chez le cheval

| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|----|-------|
| Second prélèvement | Stress faible | Stress élevé | | |
| Stress faible | 15 | 0 | 15 | |
| Stress élevé | 0 | 0 | 0 | |
| Total | 15 | 0 | 15 | |

Tableau 34 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 3 à 120 secondes – Etude de la reproductibilité chez le cheval

| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|----|-------|
| Second prélèvement | Stress faible | Stress élevé | | |
| Stress faible | 14 | 1 | 15 | |
| Stress élevé | 0 | 0 | 0 | |
| Total | 14 | 1 | 15 | |

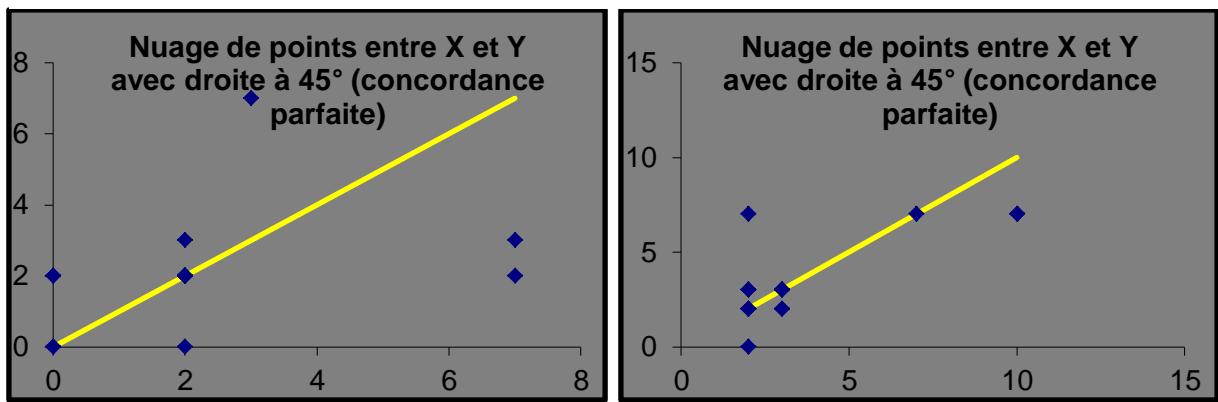
Compte tenu de la répartition des résultats, le coefficient kappa ne peut être calculé à 30 secondes et à 120 secondes pour la troisième méthode. Tout comme la deuxième méthode de prélèvements, la reproductibilité de la troisième méthode ne peut donc pas être évaluée par cette approche statistique.

2.3.2.2.4. Méthode 4

Coefficient de Lin

Concernant la quatrième méthode qui consiste à prélever la salive sur un écouvillon puis à l'étaler par roulement sur la bandelette, le coefficient de Lin est de 0,34 soit inacceptable à 30 secondes et de 0,73 soit moyennement satisfaisant à 120 secondes. On peut en effet remarquer sur la Figure 42 à 30 secondes que de nombreux points sont très éloignés de la droite de concordance parfaite. A 120 secondes, les points sont plus proches de cette droite, ce qui justifie que le coefficient de concordance de Lin soit meilleur qu'à 30 secondes mais certains en restent tout de même trop éloignés pour que le coefficient soit bon. Ainsi la quatrième méthode n'est pas reproductible d'après le coefficient de Lin.

Figure 42 : Représentation graphique du coefficient de Lin pour la quatrième méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la reproductibilité chez le cheval

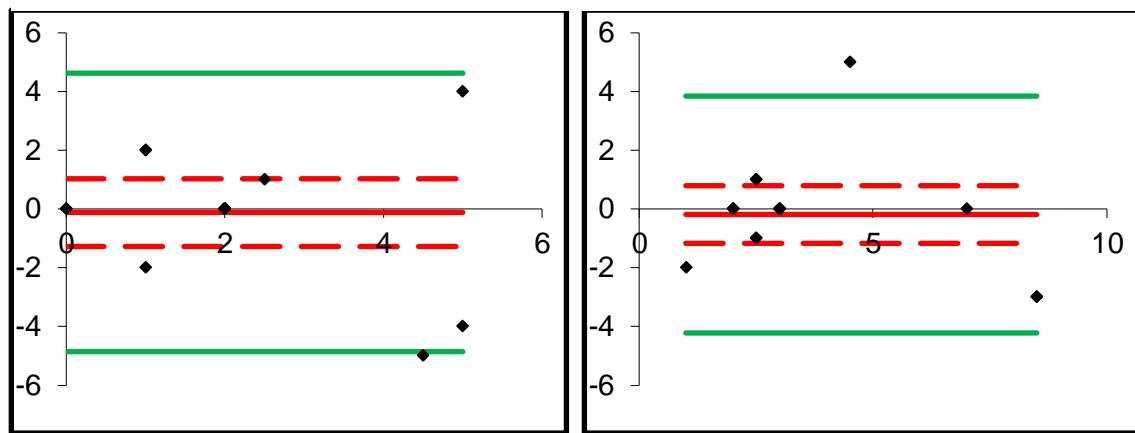


Bland et Altman

On peut tout d'abord remarquer que les points représentés sur la Figure 43 ne forment pas de cône ouvert à gauche et fermé à droite. Par conséquent, les valeurs du biais et des limites

d'agrément sont *a priori* interprétables. Les deux droites vertes indiquent que 95% des écarts relatifs entre les deux prélèvements sont compris entre -4,86 et +4,61 à 30 secondes et entre -4,22 et +3,84 à 120 secondes. Le coefficient de répétabilité est donc de 4,74 à 30 secondes et de 4,03 à 120 secondes. Ce coefficient est donc supérieur à 3, limite fixée *a priori*, aussi bien à 30 secondes qu'à 120 secondes. Ainsi, le critère de Bland et Altman n'étant pas vérifié, cette méthode n'est pas reproductible.

Figure 43 : Graphique de Bland et Altman représentant la concordance des mesures entre le premier prélèvement et le second prélèvement par la quatrième méthode à 30 secondes (à gauche) et à 120 secondes (à droite) – Etude de la reproductibilité chez le cheval



Coefficient Kappa

Le coefficient Kappa est de -0,09 à 30 secondes, soit très mauvais et de 0,82 à 120 secondes, soit très bon. Ainsi, la concordance étant mauvaise à 30 secondes, la méthode 4 n'est pas reproductible selon le calcul du coefficient Kappa. Les résultats des prélèvements à 30 secondes et à 120 secondes sont regroupés respectivement dans le Tableau 35 et le Tableau 36.

Tableau 35 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 4 à 30 secondes – Etude de la reproductibilité chez le cheval

| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|--------------|-------|
| | | Stress faible | Stress élevé | |
| Second prélèvement | Stress faible | 13 | 2 | 15 |
| | Stress élevé | 1 | 0 | 1 |
| Total | | 14 | 2 | 16 |

Tableau 36 : Répartition des résultats selon le prélèvement par la méthode 4 à 120 secondes – Etude de la reproductibilité chez le cheval

| | | Premier prélèvement | | Total |
|-----------------------|---------------|---------------------|--------------|-------|
| | | Stress faible | Stress élevé | |
| Second prélèvement | Stress faible | 12 | 0 | 12 |
| | Stress élevé | 1 | 3 | 4 |
| Total | | 13 | 3 | 16 |

2.3.2.2.5. Bilan sur la reproductibilité

Tableau 37 : reproductibilité de chaque méthode selon l'approche statistique choisie chez le cheval

| | Méthode 1 | Méthode 2 | Méthode 3 | Méthode 4 |
|------------------------|-----------|---------------|---------------|-----------|
| Lin | Mauvaise | Mauvaise | Mauvaise | Mauvaise |
| Bland et Altman | Mauvaise | Mauvaise | Mauvaise | Mauvaise |
| Kappa | Mauvaise | Non évaluable | Non évaluable | Mauvaise |

Ainsi aucune des méthodes de prélèvement ne semble être reproductible dans le temps chez le cheval, et ce quelle que soit l'approche statistique choisie (Tableau 37).

2.4. Discussion

2.4.1. Technique de prélèvements

A l'issue des premiers prélèvements, plusieurs avantages et inconvénients ont été observés pour chacune des méthodes. D'une part il est plus facile de prélever la salive à l'aide de l'écouillon plutôt que de placer la bandelette directement dans la bouche. D'autre part, la salive étant de consistance visqueuse, une imprégnation non homogène de la salive sur la bandelette était remarquée dans la première méthode consistant à introduire directement la bandelette dans la bouche de l'animal. De ce fait, il était courant d'avoir un doute entre des traces formant des points vert éparpillés sur la bandelette et un résultat de type une croix, deux croix ou trois croix selon la couleur des points verts. Ainsi, en utilisant la méthode 1, 16,4% des résultats étaient douteux. Ce problème a également été rencontré sur la méthode 4. Là encore, la salive étant visqueuse, l'imprégnation de la bandelette n'était pas toujours homogène ce qui a conduit à 6,4% de résultats douteux. Au contraire, les méthodes avec dilution permettaient une bonne imprégnation, homogène sur les bandelettes et donc de limiter ces résultats douteux (1,2% pour la dilution à 300µL).

Le choix de la méthode de prélèvement est difficile car il nécessite de faire des compromis entre la praticité de la méthode et la précision quant au volume prélevé en particulier. Chez le chien, plusieurs méthodes de prélèvements de salive ont été décrites selon les études. La forme et le matériau utilisés pour le prélèvement peuvent varier (Lenssen *et al.*, 2015). Ainsi, il est possible de prélever de la salive avec du coton, de l'hydrocellulose, du polyéthylène, du polyester. Le choix du matériau de va pas seulement jouer sur la quantité de salive prélevée mais également sur la composition de cette salive. Par exemple, il semble que le volume prélevé sur du coton soit inférieur au volume prélevé avec des matériaux synthétiques comme le polyester et ou le polyéthylène. L'utilisation du coton comme matériau de prélèvement pourrait influencer les résultats de l'analyse de différentes molécules tels que les immunoglobulines A ou la testostérone. Ces variations pourraient être dues à l'adhérence de ces molécules aux fibres de coton ou encore à la rétention d'eau par le coton pouvant modifier les concentrations en électrolytes. En humaine, les prélèvements peuvent se faire à l'aide de petites cupules en plastique qui permettent de récolter la salive dans la bouche ou par crachat. Ces techniques permettent de récolter un volume plus constant de salive et de ne créer aucune interférence entre la salive

et un quelconque matériau. Cependant, ces méthodes ne sont pas réalisables chez les animaux (Lenssen *et al.*, 2015).

Au cours de notre étude nous avons choisi pour les méthodes 2, 3 et 4 des écouvillons en coton car il est facile de s'en procurer, leur coût est faible et leur utilisation est facile. Cependant, il n'est pas exclu que le coton interfère avec la quantité de MPO analysée et que les résultats soient donc biaisés. La problématique était la même pour la méthode 1, l'application de la salive directement sur la bandelette n'assurant en aucun cas un étalement constant de la salive sur la bandelette et encore moins une quantité constante de salive prélevée.

2.4.2. Méthode de dosage choisie

La méthode de dosage peut également interférer avec le résultat. En effet lors des dilutions à 300 et à 600µL nous avons pu observer que certains animaux présentaient un résultat élevé (au plafond de la réaction) en MPO lors d'une dilution à 300µl et un résultat négatif à 600µl. Ainsi, le risque de diluer à 300µl était de considérer des animaux comme souffrant d'un état inflammatoire important alors qu'ils sont stables par rapport au repos et donc à terme de considérer que des animaux ne peuvent continuer la course alors qu'ils sont dans le même état physique qu'au départ. Au contraire diluer à 600µl entraîne le risque d'augmenter le nombre de faux négatifs et donc de passer à côté d'animaux à risque.

En 1994, Thomas et al. ont établi qu'étant donné la variabilité des résultats sur des échantillons provenant d'un même individu à un même moment, il pouvait être nécessaire de faire ces mesures sur plusieurs échantillons d'un individu afin d'établir un résultat portant sur une moyenne de ces échantillons. Ainsi, on peut penser que la quantité de MPO dans la salive peut varier en fonction de la zone prélevée ce qui expliquerait les mauvais résultats de répétabilité (Thomas *et al.*, 1994).

2.4.3. Evaluation des résultats en fonction de la méthode statistique choisie

Trois méthodes statistiques étaient testées lors de cette étude, le coefficient de Lin, la méthode de Bland et Altman et le coefficient Kappa. Dans le cas de la répétabilité chez le chien, les résultats sont les mêmes quelle que soit la méthode statistique choisie. Ainsi pour les trois analyses, la méthode 4 uniquement est répétable chez le chien. Cependant chez le cheval, alors que la méthode de Lin donne de bons résultats pour la répétabilité des méthodes 1 et 4, Bland et Altman amène aux conclusions inverses. De même dans le cadre de la reproductibilité chez le chien, seul le coefficient Kappa permet de conclure que la méthode 4 est reproductible. Chez le cheval, la reproductibilité est mauvaise quelle que soit l'analyse statistique choisie. L'utilisation du coefficient Kappa qui consistait à regrouper les résultats en deux catégories permettait de limiter les effets de variations inhérentes au prélèvement (quantité de salive et également variable) cependant cette méthode rendait

souvent le calcul non évaluable étant donné qu'il arrivait que tous les animaux soient uniquement dans l'une des deux catégories.

Ainsi, les conclusions peuvent varier selon l'analyse statistique choisie, or chacune des analyses statistiques est justifiée et choisir d'apporter du crédit à l'une plus qu'à l'autre est difficile.

2.4.4. Comparaison des deux espèces

D'après cette étude, il semble que la répétabilité du test soit correcte chez le chien lorsque le prélèvement de salive est effectué par la méthode 4 (prélèvement par écouvillon et également sur bandelette) alors qu'elle est bonne chez le cheval quelle que soit la méthode de prélèvement choisie. La reproductibilité du test est mauvaise chez les deux espèces.

Les difficultés rencontrées ne sont pas les mêmes en fonction des espèces, par exemple la quantité de salive prélevée était plus importante chez le cheval et les prélèvements étaient plus faciles à réaliser chez le cheval. De plus on peut supposer que la composition salivaire étant différente chez le chien et le cheval cela peut avoir un impact non négligeable sur les résultats observés. En particulier le pH salivaire du cheval étant plus élevé (animal herbivore) la réaction avec la bandelette peut être différente.

2.5. Conclusion de la partie expérimentale

Cette étude consistait à tester la répétabilité et la reproductibilité d'un test salivaire visant à évaluer l'état inflammatoire global de l'organisme chez le chien et le cheval selon différentes méthodes de prélèvements. En conclusion, il semble que le test soit répétable mais non reproductible chez le cheval quelle que soit la méthode choisie. Chez le chien la quatrième méthode prélèvement uniquement est répétable mais n'est pas reproductible.

Cette étude présente plusieurs limites :

- Premièrement, la corrélation entre le résultat positif de la bandelette et un réel état inflammatoire de l'organisme de l'animal n'a pas été vérifiée. Pour cela, il faudrait tester sur chaque animal la bandelette d'une part et une molécule connue pour refléter l'état inflammatoire de l'animal dans le sang telle que la CRP chez

le chien ou le fibrinogène chez le cheval. Ceci n'a pas été réalisé ici pour des raisons de moyens et un partenariat avec un laboratoire aurait pu être envisagé si l'étude préliminaire avait donné des conclusions positives. Cette étape serait essentielle dans un second temps si le test s'avérait répétable et reproductible ce qui n'est pas le cas ici ;

- Deuxièmement, il serait intéressant de rechercher une corrélation entre le résultat de la bandelette et la concentration réelle de la myéloperoxydase dans la salive afin de s'assurer qu'une coloration de la bandelette reflétait une augmentation de cette enzyme. Là encore cette étape aurait pu être réalisée en partenariat avec un laboratoire si le test s'était avéré répétable et reproductible ;
- Comme supposé ci-dessus, la quantité de salive prélevée et l'étalement inconstant de la salive sur la bandelette ont pu conduire à des biais dans les résultats.

CONCLUSION

L'inflammation est un processus complexe, mettant en jeu de nombreux types cellulaires et de nombreuses molécules. Elle intervient dès lors que l'organisme se sent « attaqué », aussi bien par des microorganismes pathogènes qu'en cas de blessure ou de maladie systémique. Les neutrophiles sont des cellules essentielles de l'inflammation ; attirés par chimiotactisme jusqu'au foyer inflammatoire, ils jouent un rôle de phagocytose primordial d'une part, et libèrent de nombreux solutés indispensables à la réaction inflammatoire d'autre part. Ainsi, la myéloperoxydase contenue dans les granules azurophiles des neutrophiles est libérée lors de leur dégranulation dans le milieu cellulaire et extra cellulaire. Cette enzyme hémique à activité peroxydase joue de nombreux rôles dans l'organisme. Elle possède tout d'abord une activité antimicrobienne, grâce à son pouvoir oxydant. Elle intervient dans le processus inflammatoire, lors de sa libération par les neutrophiles, elle participe à l'activation et à l'inactivation de nombreuses enzymes ainsi qu'à la destruction des tissus conjonctifs altérés lors d'une inflammation localisée. Enfin elle est responsable de la synthèse directe ou indirecte de nombreuses espèces oxydantes qui participent à la défense de l'hôte. Si la réaction inflammatoire devient incontrôlée, la dégranulation massive et la mort des neutrophiles entraînent un relargage massif de MPO dans le milieu extracellulaire, ce qui explique que la MPO soit utilisée désormais comme marqueur de l'intensité d'une réaction inflammatoire dans de nombreuses maladies. Son utilité a en effet déjà été démontrée dans le cadre de maladies cardiaques, d'infections, de la maladie d'Alzheimer ou encore dans le suivi d'exercices physiques demandant un effort important à l'organisme.

Notre étude, portant sur 17 chiens et 16 chevaux au repos avait pour but de tester la répétabilité et la reproductibilité d'un test de dépistage salivaire de l'inflammation, par un dosage indirect et qualitatif de la quantité de MPO dans la salive. Ainsi, quatre méthodes de prélèvements étaient testées et trois analyses statistiques ont permis d'aboutir aux résultats. Il apparaît chez le chien que seule la méthode consistant à prélever la salive sur un écouvillon puis à l'étaler directement sur la bandelette, soit répétable, mais elle n'est pas reproductible. Chez le cheval, les quatre méthodes évaluées sont répétables mais aucune n'est reproductible. Les quantités inconstantes de salive prélevée, la localisation variable du prélèvement dans la bouche, la possibilité de prélever une salive contaminée par du sang

(tartre ou plaie dans la cavité buccale) ou encore l'état de stress des animaux sont autant de paramètres pouvant être à l'origine d'une variation dans les résultats.

Il serait intéressant à l'avenir de rechercher les causes favorisant la mauvaise répétabilité ou la mauvaise reproductibilité de ce test afin de les améliorer. Dans l'immédiat, la mauvaise reproductibilité, voire répétabilité du test étudié nous incite à ne pas envisager une utilisation en pratique quotidienne de ce test, les éléments entraînant une variation des résultats n'étant pas en lien direct avec une réelle variation du statut inflammatoire.

BIBLIOGRAPHIE

- ABBAS A.K., LICHTMAN A.H., PLLAI S. (2015) Leukocyte-endothelial interactions and leukocyte recruitment into tissues. In *Cellular and Molecular Immunology, Eight Edition, Student Consult*. Elsevier, pp 41-43
- ABU-SOUD H.M., HAZEN S.L. (2000) Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* 275(8), 5425-5430
- AGNER K. (1941) Verdoperoxydase. A ferment isolated from leucocytes. *Acta PhysiolScand*, 1-62
- AKERS M.R., DENBOW M.D. (2013a) Cardiovascular system. In *Anatomy and physiologie of domestic animals. Second Edition.*, WILEY Blackwell. ed. John wiley & Sons, Inc, pp 375-377
- AKERS M.R., DENBOW M.D. (2013b) Digestive system. In *Anatomy and Physiology of Domestic Animals. Second Edition.*, WILEY Blackwell. ed. John wiley & Sons, Inc, pp 489-491
- AKERS M.R., DENBOW M.D. (2013c) Peripheral and autonomic nervous system. In *Anatomy and Physiology of Domestic Animals. Second Edition.*, WILEY Blackwell. ed. John wiley & Sons, Inc, pp 285-286
- ARAFAT S.N., SUELVES A.M., SPURR-MICHAUD S., et al. (2014) Neutrophil Collagenase, Gelatinase, and Myeloperoxidase in Tears of Patients with Stevens-Johnson Syndrome and Ocular Cicatricial Pemphigoid. *Ophthalmology* 121(1), 79-87
- BABIOR B.M. (2000) Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.* 109(1), 33-44
- BAINTON D.F., ULLYOT J.L., FARQUHAR M.G. (1971) The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J. Exp. Med.* 134(4), 907-934
- BAINTON D.F., FARQUHAR M.G. (1968) DIFFERENCES IN ENZYME CONTENT OF AZUROPHIL AND SPECIFIC GRANULES OF POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES. *J. Cell Biol.* 39(2), 286-298
- BLAIR S.N., KOHL H.W., GORDON N.F., PAFFENBARGER R.S. (1992) How much physical activity is good for health? *Annu. Rev. Public Health* 13, 99-126

- BLAND J.M., ALTMAN D.G. (1999) Measuring agreement in method comparison studies. *Stat. Methods Med. Res.* 8(2), 135-160
- BRADLEY P.P., CHRISTENSEN R.D., ROTHSTEIN G. (1982) Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood* 60(3), 618-622
- BUTTERY L.D., SPRINGALL D.R., CHESTER A.H., *et al.* (1996) Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 75(1), 77-85
- CIRAGIL P., KURUTAS E.B., MIRALOGLU M. (2014) New Markers: Urine Xanthine Oxidase and Myeloperoxidase in the Early Detection of Urinary Tract Infection. *Dis. Markers* 2014, 269-362
- CLOS J. (2012) L'inflammation : un « mal nécessaire ». In *L'immunité chez les animaux et les végétaux*, LAVOISIER. ed. pp 283-298
- CORDONNIER N. (2016) Immunologie et infectiologie générale : Hématologie, présentation générale. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité d'embryologie, histologie et Anatomie Pathologique
- COWLAND J.B., BORREGAARD N. (2016) Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol. Rev.* 273(1), 11-28
- DEBY-DUPONT G., GRÜLKE S., CAUDRON I., *et al.* (1998) Equine neutrophil myeloperoxidase in plasma: design of a radio-immunoassay and first results in septic pathologies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 66(3-4), 257-271
- DESQUILBET L. (2017) Répétabilité, reproductibilité et concordance de méthodes de mesures. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Département des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques
- EDWARDS S.W., NURCOMBE H.L., HART C.A. (1987) Oxidative inactivation of myeloperoxidase released from human neutrophils. *Biochem. J.* 245(3), 925-928
- ENGELMANN I., DORMANN S., SARAN M., BAUER G. (2000) Transformed target cell-derived superoxide anions drive apoptosis induction by myeloperoxidase. *Redox Rep.* 5(4), 207-214

- FRANCK T., GRULKE S., DEBY-DUPONT G., *et al.* (2005) Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Specific Equine Neutrophil Myeloperoxidase Measurement in Blood. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17(5), 412-419
- GIAVARINA D. (2015) Understanding Bland Altman analysis. *Biochem. Medica* 25(2), 141-151
- GILLES R., ANCTIL M., BAGUET F., *et al.* (2006a) Les échanges de matières, circulation sanguine/sang. In *Physiologie animale*, De Boek Université. ed. De Boek & Larcier s.a., pp 156-157
- GILLES R., ANCTIL M., BAGUET F., *et al.* (2006b) Les échanges de matières - Nutrition/réserves. In *Physiologie animale*, De Boek Université. ed. De Boek & Larcier s.a., pp 247-248
- GREEN P.S., MENDEZ A.J., JACOB J.S., *et al.* (2004) Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 90(3), 724-733
- GRULKE S., BENBAREK H., CAUDRON I., *et al.* (1999) Plasma myeloperoxidase level and polymorphonuclear leukocyte activation in horses suffering from large intestinal obstruction requiring surgery: preliminary results. *Can. J. Vet. Res.* 63(2), 142-147
- GRULKE S., FRANCK T., GANGL M., *et al.* (2008) Myeloperoxidase assay in plasma and peritoneal fluid of horses with gastrointestinal disease. *Can. J. Vet. Res.* 72(1), 37-42
- HAMPTON M.B., KETTLE A.J., WINTERBOURN C.C. (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92(9), 3007-3017
- HANSSON M., OLSSON I., NAUSEEF W.M. (2006) Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 445(2), 214-224
- HARRISON J.E., SCHULTZ J. (1976) Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* 251(5), 1371-1374
- HAZEN S.L., ZHANG R., SHEN Z., *et al.* (1999) Formation of Nitric Oxide-Derived Oxidants by Myeloperoxidase in Monocytes: Pathways for Monocyte-Mediated Protein Nitration and Lipid Peroxidation In Vivo. *Circ. Res.* 85(10), 950-958
- HAZEN S.L., HEINECKE J.W. (1997) 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J. Clin. Invest.* 99(9), 2075-2081

- HILLEGASS L.M., GRISWOLD D.E., BRICKSON B., ALBRIGHTSON-WINSLOW C. (1990) Assessment of myeloperoxidase activity in whole rat kidney. *J. Pharmacol. Methods* 24(4), 285-295
- HINES M.T., SCHOTT H.T., BAYLY W.M., LEROUX A.J. (1996) exercise and immunity : a review with emphasis on the horse. *J. Vet. Intern. Med.* 10, 280-289
- HIRSCH J.G., COHN Z.A. (1960) Degranulation of polymorphonuclear leucocytes following phagocytosis of microorganisms. *J. Exp. Med.* 112(6), 1005-1014
- KETTLE A.J., WINTERBOURN C.C. (1997) Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. *Redox Rep. Commun. Free Radic. Res.* 3(1), 3-15
- KING C.C., JEFFERSON M.M., THOMAS E.L. (1997) Secretion and inactivation of myeloperoxidase by isolated neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 61(3), 293-302
- KITAHARA M., J. EYRE H., SIMONIAN Y., L. ATKIN C., J. HASSTEDT S. (1981) Hereditary Myeloperoxidase Deficiency. *Blood J.* 62, 88-893
- KJELDSEN L., BAINTON D.F., SENGELOV H., BORREGAARD N. (1993) Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase- containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation. *Blood* 82(10), 3183-3191
- KLANGPRAPAN S., CHAIYARIT P., HORMDEE D., et al. (2016) Salivary Myeloperoxidase, Assessed by 3,3'-Diaminobenzidine Colorimetry, Can Differentiate Periodontal Patients from Nonperiodontal Subjects. *Enzyme Res.* n°..., 1-6
- KLEBANOFF S.J. (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* 77(5), 598-625
- KLEIN B.G. (2013a) Overview of Cardiovascular Function. In *Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology. Fifth Edition.*, Elsevier. ed. pp 165-167
- KLEIN B.G. (2013b) Secretions of the Gastrointestinal tract. In *Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology*, Elsevier. ed. pp 288-289
- KOEFFLER P., RANYARD J., PERTCHECK M. (1985) Myeloperoxidase its structure and expression during myeloid differentiation. *Blood* 65, 484-491
- LABORATOIRE SIEMENS (2011) Notice d'utilisation des bandelettes réactives HEMASTIX.

- LANDIS J.R., KOCH G.G. (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33(1), 159-174
- LANZA F. (1998) Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. *J. Mol. Med.* 76(10), 676-681
- LENSEN C.M.M., MOONS C.P.H., DIEDERICH C. (2015) Saliva sampling in dogs: How to select the most appropriate procedure for your study. *J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res.* 10(6), 504-512
- LIN L.I. (1989) A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics* 45(1), 255-268
- LORIA V., DATO I., GRAZIANI F., BIASUCCI L.M. (2008) Myeloperoxidase: A New Biomarker of Inflammation in Ischemic Heart Disease and Acute Coronary Syndromes. *Mediators Inflamm.* 2008
- MALLE E., BUCH T., GRONE H.-J. (2003) Myeloperoxidase in kidney disease. *Kidney Int.* 64(6), 1956-1967
- MCCARTHY D.A., DALE M.M. (1988) The leucocytosis of exercise. A review and model. *Sports Med. Auckl. NZ* 6(6), 333-363
- MCCONNICO R.S., WEINSTOCK D., POSTON M.E., ROBERT M.C. (1999) Myeloperoxidase activity of the large intestine in an equine model of acute colitis. *Am J Vet Res* 60, 807-813
- MELANSON S.E.F., GREEN S.M., WOOD M.J., NEILAN T.G., LEWANDROWSKI E.L. (2006) Elevation of Myeloperoxidase in Conjunction With Cardiac-Specific Markers After Marathon Running. *Am. J. Clin. Pathol.* 126(6), 888-893
- MEYRIER S. (2003) Les causes d'élimination en épreuves d'endurance équestre : étude rétrospective menée en france en 2001. Thèse Méd. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse Vét. n°3
- MITTELMAN M.A., MACLURE M., TOFLER G.H., *et al.* (1993) Triggering of acute myocardial infarction by heavy physical exertion. Protection against triggering by regular exertion. Determinants of Myocardial Infarction Onset Study Investigators. *N. Engl. J. Med.* 329(23), 1677-1683

- NICHOLLS S.J., HAZEN S.L. (2005) Myeloperoxidase and Cardiovascular Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25(6), 1102-1111
- NUSSBAUM C., KLINKE A., ADAM M., BALDUS S., SPERANDIO M. (2013) Myeloperoxidase: A Leukocyte-Derived Protagonist of Inflammation and Cardiovascular Disease. *Antioxid. Redox Signal.* 18(6), 692-713
- ODELL E.W., SEGAL A.W. (1988) The bactericidal effects of the respiratory burst and the myeloperoxidase system isolated in neutrophil cytoplasts. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 971(3), 266-274
- OLZA J., AGUILERA C.M., GIL-CAMPOS M., et al. (2012) Myeloperoxidase Is an Early Biomarker of Inflammation and Cardiovascular Risk in Prepubertal Obese Children. *Diabetes Care* 35(11), 2373-2376
- ORMROD D.J., HARRISON G.L., MILLER T.E. (1987) Inhibition of neutrophil myeloperoxidase activity by selected tissues. *J. Pharmacol. Methods* 18(2), 137-142
- PARK J.-I., SUH S.-I., HYUN C. (2017) Evaluation of serum myeloperoxidase concentration in dogs with heart failure due to chronic mitral valvular insufficiency. *Can. J. Vet. Res.* 81(1), 37-40
- PODREZ E.A., ABU-SOUD H.M., HAZEN S.L. (2000) Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* 28(12), 1717-1725
- ROGALEV A. (2011) Organisation de l'équipe vétérinaire de la course de chiens de traineau longue distance « Yukon Quest » approche statistique des affections spécifiques rencontrées sur les éditions 2006, 2007 et 2009. Thèse Med. Vet. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.
- RUTGERS A., HEERINGA P., TERVAERT J.C. (2003) The role of myeloperoxidase in the pathogenesis of systemic vasculitis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 21(6; SUPP/32), S55-S63
- SCOTT A. (2004) What is « inflammation »? Are we ready to move beyond Celsius? *Br. J. Sports Med.* 38(3), 248-249
- SEGAL A.W., GEISOW M., GARCIA R., HARPER A., MILLER R. (1981) The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature* 290(5805), 406-409

- SENA A. (2007) Suivi clinique des chevaux d'endurance. Thèse Méd. Vét. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.
- SERTEYN D., GRULKE S., FRANCK T., MOUITHYS-MICKALAD A., DEBY-DUPONT G. (2003) La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann Méd Vét* 147, 79–93
- SERTEYN D., SANDERSEN C., LEJEUNE J.-P., *et al.* (2010) Effect of a 120 km endurance race on plasma and muscular neutrophil elastase and myeloperoxidase concentrations in horses. *Equine Vet. J.* 42, 275–279
- SHARP N.C., KOUTEDAKIS Y. (1992) Sport and the overtraining syndrome: immunological aspects. *Br. Med. Bull.* 48(3), 518–533
- STEINHOFF J., EINECKE G., NIEDERSTADT C., *et al.* (1997) Myeloperoxidase in urine: a new marker for distinction between rejection and urinary tract infection after renal transplantation. *Transplant. Proc.* 29(7), 3098
- STENDAHL O., COBLE B.I., DAHLGREN C., HED J., MOLIN L. (1984) Myeloperoxidase modulates the phagocytic activity of polymorphonuclear neutrophil leukocytes. Studies with cells from a myeloperoxidase-deficient patient. *J. Clin. Invest.* 73(2), 366–373
- SUZUKI K., MACHIDA K. (1995) Effectiveness of lower-level voluntary exercise in disease prevention of mature rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* 71(2–3), 240–244
- SWETS B.P., BROUWER D.A.J., TERVAERT J.W.C. (2001) Patients with systemic vasculitis have increased levels of autoantibodies against oxidized LDL. *Clin. Exp. Immunol.* 124(1), 163–167
- TENG N., MAGHZAL G.J., TALIB J., *et al.* (2017) The roles of myeloperoxidase in coronary artery disease and its potential implication in plaque rupture. *Redox Rep.* 22(2), 51–73
- THOMAS E.L., JEFFERSON M.M., JOYNER R.E., COOK G.S., KING C.C. (1994) Leukocyte Myeloperoxidase and Salivary Lactoperoxidase: Identification and Quantitation in Human Mixed Saliva. *J. Dent. Res.* 73(2), 544–555
- TJELLE T.E., LOVDAL T., BERG T. (2000) Phagosome dynamics and function. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 22(3), 255–263

- WANG W., JIAN Z., GUO J., NING X. (2014) Increased levels of serum myeloperoxidase in patients with active rheumatoid arthritis. *Life Sci.* 117(1), 19-23
- WINTERBOURN C.C., KETTLE A.J. (2000) Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.* 29(5), 403-409
- WONG C.W., SMITH S.E., THONG Y.H., OPDEBEECK J.P., THORNTON J.R. (1992) Effects of exercise stress on various immune functions in horses. *Am. J. Vet. Res.* 53(8), 1414-1417
- YAMADA M., SUZUKI K., KUDO S., *et al.* (2000) Effect of exhaustive exercise on human neutrophils in athletes. *Luminescence* 15(1), 15-20

ANNEXES

Annexe 1: Notice des bandelettes HEMASTIX.

SIEMENS

Bandelettes réactives HEMASTIX®

Test destiné à détecter la présence de sang dans l'urine.

DOMAINE D'UTILISATION :

Les bandelettes réactives HEMASTIX sont conçues à des fins d'aide-controlle pour les patients et pour les professionnels de la santé dans le but de détecter la présence de sang dans l'urine.^{1,2}

Il est important de lire entièrement la notice des bandelettes HEMASTIX avant de commencer les analyses. Il convient de suivre soigneusement les instructions. Un minutage précis est essentiel pour obtenir des résultats optimaux.

La bandelette réactive HEMASTIX est préte à l'emploi; dès sa sortie du flacon. Elle est à usage unique. Ces analyses ne nécessitent aucun équipement de laboratoire supplémentaire.

RECUEIL ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS :

Se laver les mains avec un nettoyant approprié puis les rincer. Recueillir l'urine dans un recipient propre et sec. Tester l'échantillon aussitôt que possible. Effectuer le tampon dans l'heure qui suit, sinon réfriger l'échantillon immédiatement. Assurer que l'urine soit conservée à température ambiante avec un protège-couche. Une conservation prolongée de l'urine à température ambiante peut entraîner le développement de microbes, risquant de fausser les résultats du test HEMASTIX. Vérifier l'espace de travail et les récipients de recueil ou doivent pas contenir de produits détergents ni autres substances pouvant affecter les résultats de votre test HEMASTIX.

ATTENTION : assurez-vous que votre espace de travail et les récipients de recueil ne contiennent pas de traces de détergents ou d'autres substances contaminantes. Certaines substances peuvent affecter les résultats des patients.

Usage professionnel : ne pas centrifuger. L'utilisation de conservateurs d'urine n'est pas recommandée.

CONSERVATION ET PRÉCAUTION D'EMPLOI :

* Ne pas utiliser les bandelettes HEMASTIX一旦 la date de péremption est expéssée.

* Conserver les bandelettes à température ambiante entre 15 et 30°C (59-86°F).

* IMPORTANT : afin de préserver la bonne réactivité des bandelettes, il est essentiel de conserver celles-ci à l'abri de l'humidité, de la lumière et de la chaleur.

* Les bandelettes réactives doivent être conservées dans leur flacon d'origine, hermétiquement fermé. Ne pas enlever le dissipant du flacon. Après avoir sorti une bandelette réactive, reboucher immédiatement et hermétiquement le flacon. Ne pas toucher la zone réactive de la bandelette.

AVERTISSEMENT : LES BANDELETTES RÉACTIVES HEMASTIX sont destinées à une utilisation diagnostique *in vitro* exclusivement. NE PAS AVALER.

MODE D'EMPLOI :

Matériaux nécessaires :

- Bandelettes réactives HEMASTIX
- Récipient propre et sec
- Monde ou miniflûte

Étape 1. Vérifier la date de péremption. Si la date de péremption est dépassée, mettre-les au rebut, puis faire les analyses avec les bandelettes réactives d'un nouveau flacon. Noter la date d'ouverture du flacon sur l'étiquette. L'utilisation de bandelettes

réactives dont la date de péremption est dépassée peut conduire à des résultats faux-positifs. Retirez la bandelette réactive du flacon. La faire décoller immédiatement et soigneusement, refermez. Ne touchez pas la zone réactive de la bandelette.

Étape 2. Immédiat : l'extrémité de la bandelette réactive dans un échantillon d'urine fraîche, bien mélange et non centrifugé, puis retirez l'immédiatement. Étirez l'excès d'urine en tapotant la tranche de la bandelette réactive sur le bord du récipient. Il est également possible de couper l'extrémité de la bandelette sous le jet d'urine. Lancez immédiatement la miniflûte.

Étape 3. 60 secondes après avoir retiré de l'urine, comparez la zone réactive à l'échelle colorimétrique figurant sur l'étiquette du flacon.

Étape 4. Notez les résultats.

RÉSULTATS :

Les résultats obtenus avec les bandelettes réactives HEMASTIX sont exprimés en unités cliniquement significatives, d'après la comparaison établie selon l'échelle colorimétrique. Les blocs de couleur correspondent à des normales : les valeurs baisses vont vers les résultats négatifs et les hautes vers les résultats positifs. Il est recommandé d'effectuer la lecture de la bandelette en totalité et immédiatement afin de ne pas détruire le réactif. Il est possible de faire une lecture en 1 ou 2 minutes pour identifier les échantillons négatifs. Lire les résultats dans les temps indiqués, à la lumière, en tenant la bandelette très près de l'échelle colorimétrique figurant sur l'étiquette du flacon.

IMPORTANT : HEMASTIX ne doit jamais servir de seule base à la modification de votre traitement médicamenteux. Toujours consulter votre médecin ou votre professionnel de santé avant de modifier votre traitement.

VALEURS DE RÉFÉRENCE POUR LE SANG [Hb] :

Un jugement clinique est nécessaire pour évaluer la signification d'un résultat à « traces ». Le détection de points vertes (érythrocytes intact) ou de la couleur verte (érythrocytes dégradés) dans la zone réactive en 60 secondes, indique l'urine d'une analyse plus approfondie. On trouve souvent de sang dans l'urine des femmes en période de menstruation.^{1,2} Ce test est extrêmement sensible à l'hémoglobine et sera alors de complément à l'examen microscopique.

SI LES RÉSULTATS DU TEST PARAissent DOUTEUX :

Ne pas utiliser les bandelettes si la zone réactive paraît plus claire ou plus foncée que le bloc témoin correspondant. Si tel est le cas, si les résultats du test sont doux ou s'ils ne correspondent pas aux résultats attendus, procéder comme suit :

1. Vérifiez la DATE DE PÉREMPTION imprimée sur l'étiquette du flacon. Si la date de péremption est dépassée, mettez-le au rebut, puis faire de nouveau les analyses avec les bandelettes réactives d'un nouveau flacon. Vérifiez la date de la première couverture du flacon.
2. Répétez le test avec une bandelette réactive provenant d'un nouveau flacon et comparez les résultats obtenus.

3. Usage professionnel : lorsque le résultat du test peut donner lieu à l'interprétation de nouveaux flacons, effectuez un test de contrôle pour vérifier le performance du système tout entier (récipient, bandelette et technique). Les bandelettes timides positives et négatives, peuvent constituer un biais primaire dans le cadre d'un programme de contrôle qualité de l'analyse d'urine. Des échantillons ou des contrôles négatifs et positifs peuvent être utilisés séparément dans chaque lot d'échantillon testé. Chaque laboratoire doit définir ses propres objectifs en matière de normes adéquates de performance.

- Si il n'est pas possible d'identifier un problème ou de la résoudre, contactez votre représentant Siemens Healthcare Diagnostics ou votre médecin.

LIMITES DE LA MÉTHODE :

Les substances responsables d'une coloration anormale de l'urine, comme les médicaments contenant des colorants azotés (par exemple Pyridium, Azo Gantrel, Azot Garzant), la rifuraquine (Macrodantin, Furadantin) et la riboflavin (vitamine C), peuvent affecter la zone réactive des bandelettes réactives. Elles peuvent masquer l'apparition d'une coloration sur le tampon réactif ou provoquer une coloration pouvant être interprétée comme une réaction faussement positive. La concentration comparativement élevée de l'urine peut rendre la réaction moins sensible. La présence d'acrylpyril (Captopril) peut également diminuer la réactivité. Certaines substances oxydantes, telles que les hypochlorites, peuvent produire des résultats faussement positifs. Les peroxydases d'origine bactérienne, en cas d'infection urinaire peuvent provoquer une réaction faussement positive. Les myéloïdes aérobiques généralement trouvés dans l'urine n'exercent aucune influence dans le cadre de l'utilisation de ce test.

PERFORMANCES :

Les performances du test ont été évaluées à partir d'études cliniques et analytiques. Dans les échantillons cliniques, la sensibilité dépend de plusieurs facteurs : la variabilité de la perception des couleurs, la présence ou l'absence de facteurs inhibiteurs généralement présents dans l'urine, la densité et le pH, ainsi que les conditions d'éclairage lors de la lecture du résultat.

Chaque bloc de couleur contient une paire de valeurs. En raison de la nature des échantillons et de la lecture, un échantillon ayant une coloration en substance à audace située entre deux taux normaux, peut avoir un résultat correspondant à l'un ou l'autre des taux. Les résultats dont le niveau est supérieur au second aux possibles se sileront généralement à moins d'un niveau de la concentration réelle. Le test détecte généralement de 0,015 à 0,062 mg/dL d'hémoglobine libre ; toutefois, en raison de la variabilité intrinsèque des urines

cliniques, des concentrations moindres peuvent être détectées sous certaines conditions. La sensibilité de ce test peut être réduite dans les urines à concentration élevée. Le test est aussi sensible au myrochrome qu'à l'hémoglobine. L'apport de myrochrome sur la zone réactive testée indique la présence d'hémoglobine intacte dans l'urine. L'échelle numérotée variant de traces à de larges élections, avec des points proportionnellement plus nombreux, peuvent être observées. Une concentration en hémoglobine de l'ordre de 0,015 à 0,062 mg/dL correspond à peu près à 5 à 20 globules rouges (traces par microlitre.)

PRINCIPES CHIMIQUES DU TEST :

Le test repose sur l'activité peroxydase de l'hémoglobine qui catalyse la réaction du chloroperoxyde de disuccinylbenzene et du 3,3'-diméthyl-3,3,5,5-tétracétide. La couleur obtenue varie entre l'orange et le vert, une concentration élevée de sang peut produire une couleur bleue.

RÉACTIFS :

(Basé sur un poids à sec au moment de l'imprégnation) 6,8% p/p disuccinylde de disuccinylbenzene; 4,0% p/p 3,3'-diméthyl-3,3,5,5-tétracétide; 48,0% p/p tampon; 41,2 % p/p oxydants.

BIBLIOGRAPHIE :

1. Adams E, et al. Simplified Test for Hematuria. *Ann. Intern. Med.* 95: 257-262.
2. Adams E, et al. Hematuria in Hematology. *J. Urol.* 88:427-432.
3. Leonards J, R. Simple test for hematuria compared with established test. *JAMA* 170:807-812.
4. Henry J.B. (ed.): *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 19th ed. Philadelphia: Saunders, 1996; pp. 151-152.
5. Howell R.G. and Howell R.: *Clinical Urinalysis: The Principles and Practice of Urine Testing in the Hospital and Community*. Buckinghamshire, UK: Bayer Corporation, 1990; pp. 25-30.

MARQUES DÉPOSÉES :

Pour connaître les marques commerciales de Siemens, reportez-vous à l'emballage du produit utilisé.

Azot Gantrel et Azo Garzant sont des marques commerciales de Hoffmann-La Roche, Inc.

Furadantin est une marque commerciale de Shilongji Pharma, Macrodantin et Pyridium sont des marques commerciales de Warner-Chilcott Company, LLC.

Captopril est une marque commerciale de Par Pharmaceutical, Inc.

ASSISTANCE TECHNIQUE :

Pour obtenir une assistance technique, veuillez contacter votre fournisseur ou distributeur local.

www.siemens.com/diagnostics

Origin: Poland

Siemens Healthcare Diagnostics Inc.

Tarrytown, NY 10591-5097 USA

EC REP

Siemens Healthcare Diagnostics Ltd.

Sir William Siemens Sq.

Frimley, Camberley, UK GU16 8QD



CE

006

© 2011 Siemens Healthcare Diagnostics. Tous droits réservés.

SIEMENS

Annexe 2 : Feuille de prise de note lors des prélevements

| ANIMAL | STATUT | Méthode 1 Bandelette | | Méthode 2 Sérum | | Méthode 3 Ecouillon | |
|--------|--------|----------------------|--------|-----------------|--------|---------------------|--------|
| | | T1 | T2 | T1 | T2 | T1 | T2 |
| | | T0 = | T0 = | T0 = | T0 = | T0 = | T0 = |
| | | T30 = | T30 = | T30 = | T30 = | T30 = | T30 = |
| | | T60 = | T60 = | T60 = | T60 = | T60 = | T60 = |
| | | T90 = | T90 = | T90 = | T90 = | T90 = | T90 = |
| | | T120 = | T120 = | T120 = | T120 = | T120 = | T120 = |
| | | T0 = | T0 = | T0 = | T0 = | T0 = | T0 = |
| | | T30 = | T30 = | T30 = | T30 = | T30 = | T30 = |
| | | T60 = | T60 = | T60 = | T60 = | T60 = | T60 = |
| | | T90 = | T90 = | T90 = | T90 = | T90 = | T90 = |
| | | T120 = | T120 = | T120 = | T120 = | T120 = | T120 = |
| | | T0 = | T0 = | T0 = | T0 = | T0 = | T0 = |
| | | T30 = | T30 = | T30 = | T30 = | T30 = | T30 = |
| | | T60 = | T60 = | T60 = | T60 = | T60 = | T60 = |
| | | T90 = | T90 = | T90 = | T90 = | T90 = | T90 = |
| | | T120 = | T120 = | T120 = | T120 = | T120 = | T120 = |
| | | T0 = | T0 = | T0 = | T0 = | T0 = | T0 = |
| | | T30 = | T30 = | T30 = | T30 = | T30 = | T30 = |
| | | T60 = | T60 = | T60 = | T60 = | T60 = | T60 = |
| | | T90 = | T90 = | T90 = | T90 = | T90 = | T90 = |
| | | T120 = | T120 = | T120 = | T120 = | T120 = | T120 = |

Annexe 3 : Résultats des prélèvements chez le chien, bandelettes et écouvillons, 30.01.2018,
première partie - étude de la répétabilité

| Animal | Temps | Bandelettes | | | ecouvillon | |
|--------|-------|-------------|---|--|------------|---|
| 973427 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 2 | | 0 | 0 |
| | 60 | 2 | 2 | | 0 | 0 |
| | 90 | 2 | 2 | | 0 | 0 |
| | 120 | 2 | 2 | | 0 | 0 |
| 973349 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 30 | 0 | 2 | | 0 | 0 |
| | 60 | 2 | 2 | | 0 | 0 |
| | 9 | 2 | 2 | | 2 | 2 |
| | 120 | 2 | 2 | | 2 | 2 |
| 284994 | 0 | 0 | 2 | | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 2 | | 2 | 2 |
| | 60 | 2 | 2 | | 2 | 2 |
| | 90 | 2 | 3 | | 2 | 2 |
| | 120 | 2 | 3 | | 2 | 2 |
| 380846 | 0 | 0 | 2 | | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 2 | | 2 | 2 |
| | 60 | 2 | 3 | | 2 | 2 |
| | 90 | 2 | 3 | | 2 | 2 |
| | 120 | 2 | 3 | | 2 | 2 |
| 307612 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 0 | | 0 | 0 |
| | 60 | 2 | 2 | | 0 | 2 |
| | 90 | 3 | 2 | | 0 | 2 |
| | 120 | 3 | 3 | | 2 | 2 |
| 284890 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 30 | 0 | 2 | | 0 | 0 |
| | 60 | 0 | 2 | | 0 | 0 |
| | 90 | 0 | 2 | | 0 | 0 |
| | 120 | 0 | 2 | | 0 | 0 |
| 314641 | 0 | 2 | 0 | | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 0 | | 2 | 2 |
| | 60 | 2 | 2 | | 2 | 2 |
| | 90 | 2 | 2 | | 2 | 2 |
| | 120 | 2 | 2 | | 2 | 2 |
| 973323 | 0 | 0 | 2 | | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 2 | | 0 | 0 |
| | 60 | 2 | 2 | | 0 | 2 |
| | 90 | 2 | 3 | | 0 | 2 |
| | 120 | 2 | 3 | | 0 | 2 |

Annexe 4 : Résultats des prélèvements chez le chien, bandelettes et écouvillons, 30.01.2018,
deuxième partie - étude de la répétabilité

| | | | | | | |
|--------|-----|----|----------|--|-----------|-----------|
| 262430 | 0 | 2 | 10 | | 2 | 0 |
| | 30 | 3 | 10 | | 10 | 7 |
| | 60 | 7 | 10 | | 10 | 7 |
| | 90 | 7 | 10 | | 10 | 10 |
| | 120 | 7 | 10 | | 10 | 10 |
| 361586 | 0 | 0 | 2 | | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 3 | | 0 | 0 |
| | 60 | 3 | 7 | | 0 | 0 |
| | 90 | 3 | 7 | | 2 | 0 |
| | 120 | 3 | 7 | | 2 | 0 |
| 660610 | 0 | 10 | 10 | | 2 | 2 |
| | 30 | 10 | 10 | | 7 | 7 |
| | 60 | 10 | 10 | | 10 | 7 |
| | 90 | 10 | 10 | | 10 | 7 |
| | 120 | 10 | 10 | | 10 | 7 |
| 766905 | 0 | 2 | 0 | | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 2 | | 2 | 2 |
| | 60 | 3 | 2 | | 2 | 2 |
| | 90 | 7 | 3 | | 2 | 2 |
| | 120 | 7 | 3 | | 2 | 2 |
| 763843 | 0 | 2 | 0 | | 0 | 0 |
| | 30 | 3 | 0 | | 0 | 0 |
| | 60 | 3 | 2 | | 2 | 2 |
| | 90 | 3 | 3 | | 2 | 2 |
| | 120 | 7 | 3 | | 2 | 2 |
| 382069 | 0 | 2 | 0 | | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 2 | | 0 | 0 |
| | 60 | 3 | 2 | | 2 | 0 |
| | 90 | 3 | 3 | | 2 | 0 |
| | 120 | 7 | 3 | | 2 | 0 |
| 591131 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 2 | | 2 | 0 |
| | 60 | 2 | 2 | | 2 | 0 |
| | 90 | 2 | 2 | | 2 | 2 |
| | 120 | 2 | 2 | | 2 | 2 |
| 730875 | 0 | 2 | 0 | | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 2 | | 0 | 0 |
| | 60 | 3 | 2 | | 0 | 2 |
| | 90 | 3 | 3 | | 0 | 2 |
| | 120 | 3 | 3 | | 2 | 2 |

Annexe 5 : Résultats des prélèvements chez le chien, dilutions, 30.01.2018, première partie - étude de la répétabilité

| | | dilution 300 | | | dilution 600 | |
|--------|-----|--------------|---|--|--------------|---|
| 973427 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 30 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 60 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 90 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 120 | 2 | 2 | | 0 | 0 |
| 973349 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 0 | | 0 | 0 |
| | 60 | 2 | 2 | | 0 | 0 |
| | 90 | 3 | 2 | | 0 | 0 |
| | 120 | 3 | 2 | | 0 | 2 |
| 284994 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 30 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 60 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 90 | 0 | 2 | | 0 | 0 |
| | 120 | 0 | 2 | | 0 | 0 |
| 380846 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 30 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 60 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 90 | 2 | 0 | | 0 | 0 |
| | 120 | 2 | 2 | | 0 | 0 |
| 314641 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 0 | | 0 | 0 |
| | 60 | 2 | 2 | | 0 | 0 |
| | 90 | 3 | 2 | | 0 | 0 |
| | 120 | 3 | 2 | | 0 | 0 |
| 973323 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 30 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 60 | 2 | 0 | | 0 | 0 |
| | 90 | 2 | 0 | | 0 | 0 |
| | 120 | 2 | 0 | | 0 | 0 |
| 339546 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 30 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 60 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 90 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 120 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| 166657 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 0 | | 0 | 0 |
| | 60 | 2 | 0 | | 0 | 0 |
| | 90 | 2 | 0 | | 0 | 2 |
| | 120 | 3 | 0 | | 0 | 2 |

Annexe 6 : Résultats des prélèvements chez le chien, dilutions, 30.01.2018, deuxième partie - étude de la répétabilité

| | | | | | |
|--------|-----|---|---|---|---|
| 262430 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | 60 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| | 90 | 3 | 2 | 0 | 0 |
| | 120 | 3 | 2 | 0 | 0 |
| 361220 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 60 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 90 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| | 120 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| 766905 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| | 60 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| | 90 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | 120 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 361586 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| | 60 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | 90 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| | 120 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| 763843 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 3 | 0 | 0 | 2 |
| | 60 | 7 | 2 | 2 | 2 |
| | 90 | 7 | 2 | 2 | 2 |
| | 120 | 7 | 2 | 2 | 2 |
| 660610 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 3 | 2 | 0 | 0 |
| | 60 | 3 | 2 | 0 | 0 |
| | 90 | 3 | 3 | 0 | 2 |
| | 120 | 7 | 3 | 2 | 2 |
| 382069 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 60 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| | 90 | 3 | 2 | 0 | 0 |
| | 120 | 3 | 2 | 0 | 2 |
| 730875 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| | 60 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | 90 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| | 120 | 3 | 3 | 2 | 2 |

Annexe 7 : Résultats des prélèvements chez le chien, 09.11.2017, première partie - étude de la reproductibilité

| 09/11/2017 | | Bandelette | Dilué | Ecouvillon |
|------------|-----|------------|-------|------------|
| 262430 | 0 | 10 | 3 | 7 |
| | 30 | 10 | 7 | 10 |
| | 60 | 10 | 7 | 10 |
| | 90 | 10 | 7 | 10 |
| | 120 | 10 | 7 | 10 |
| 455498 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 7 | 7 | 7 |
| | 60 | 8,5 | 7 | 7 |
| | 90 | 8,5 | 7 | 10 |
| | 120 | 8,5 | 7 | 10 |
| 339546 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 0 | 0 | 0 |
| | 60 | 0 | 0 | 2 |
| | 90 | 0 | 0 | 2 |
| | 120 | 0 | 0 | 2 |
| 197310 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 10 | 0 | 0 |
| | 60 | 10 | 2 | 2 |
| | 90 | 10 | 2 | 2 |
| | 120 | 10 | 2 | 2 |
| 382069 | 0 | 3 | 3 | 3 |
| | 30 | 10 | 7 | 10 |
| | 60 | 10 | 10 | 10 |
| | 90 | 10 | 10 | 10 |
| | 120 | 10 | 10 | 10 |
| Beaugosse | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 0 | 0 | 0 |
| | 60 | 0 | 0 | 2 |
| | 90 | 2 | 2 | 3 |
| | 120 | 2 | 2 | 3 |
| 314641 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 2 | 2 |
| | 60 | 2 | 3 | 2 |
| | 90 | 2 | 3 | 2 |
| | 120 | 2 | 3 | 2 |
| 973427 | 0 | 0 | 3 | 2 |
| | 30 | 7 | 7 | 7 |
| | 60 | 10 | 7 | 7 |
| | 90 | 10 | 7 | 10 |
| | 120 | 10 | 7 | 10 |
| 973349 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 0 | 0 | 0 |
| | 60 | 0 | 0 | 0 |
| | 90 | 2 | 2 | 2 |
| | 120 | 2 | 2 | 2 |

Annexe 8 : Résultats des prélèvements chez le chien, 09.11.2017, deuxième partie - étude de la reproductibilité

| | | | | |
|--------|-----|----|----|----|
| 361586 | 0 | 0 | 3 | 3 |
| | 30 | 0 | 3 | 7 |
| | 60 | 0 | 3 | 7 |
| | 90 | 2 | 3 | 10 |
| | 120 | 2 | 3 | 10 |
| 380846 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | 30 | 2 | 2 | 3 |
| | 60 | 2 | 2 | 3 |
| | 90 | 3 | 2 | 7 |
| | 120 | 7 | 3 | 7 |
| 763843 | 0 | 0 | 3 | 7 |
| | 30 | 2 | 7 | 10 |
| | 60 | 7 | 10 | 10 |
| | 90 | 7 | 10 | 10 |
| | 120 | 7 | 10 | 10 |
| 660610 | 0 | 10 | 3 | 7 |
| | 30 | 10 | 10 | 10 |
| | 60 | 10 | 10 | 10 |
| | 90 | 10 | 10 | 10 |
| | 120 | 10 | 10 | 10 |
| 759131 | 0 | 3 | 3 | 3 |
| | 30 | 7 | 3 | 7 |
| | 60 | 7 | 7 | 10 |
| | 90 | 10 | 7 | 10 |
| | 120 | 10 | 10 | 10 |
| 766905 | 0 | 10 | 3 | 10 |
| | 30 | 10 | 7 | 10 |
| | 60 | 10 | 10 | 10 |
| | 90 | 10 | 10 | 10 |
| | 120 | 10 | 10 | 10 |
| 730875 | 0 | 3 | 3 | 3 |
| | 30 | 7 | 10 | 7 |
| | 60 | 7 | 10 | 10 |
| | 90 | 10 | 10 | 10 |
| | 120 | 10 | 10 | 10 |
| 393064 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| | 30 | 7 | 2 | 2 |
| | 60 | 7 | 3 | 2 |
| | 90 | 7 | 3 | 3 |
| | 120 | 7 | 7 | 7 |

Annexe 9 : Résultats des prélèvements chez le chien, 10.11.2017, première partie - étude de la reproductibilité

| 10/11/2017 | | Bandelette | Dilué | Ecouvillon |
|------------|-----|------------|-------|------------|
| 262430 | 0 | 10 | 2 | 7 |
| | 30 | 10 | 2 | 7 |
| | 60 | 10 | 3 | 10 |
| | 90 | 10 | 3 | 10 |
| | 120 | 10 | 3 | 10 |
| 455498 | 0 | 0 | 3 | 2 |
| | 30 | 7 | 7 | 7 |
| | 60 | 10 | 7 | 7 |
| | 90 | 10 | 7 | 10 |
| | 120 | 10 | 7 | 10 |
| 339546 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 0 | 0 |
| | 60 | 3 | 2 | 2 |
| | 90 | 3 | 2 | 2 |
| | 120 | 7 | 2 | 2 |
| 197310 | 0 | 3 | 2 | 0 |
| | 30 | 7 | 3 | 2 |
| | 60 | 10 | 7 | 2 |
| | 90 | 10 | 7 | 2 |
| | 120 | 10 | 8,5 | 2 |
| 382069 | 0 | 3 | 2 | 0 |
| | 30 | 7 | 3 | 0 |
| | 60 | 7 | 7 | 2 |
| | 90 | 7 | 7 | 2 |
| | 120 | 10 | 10 | 2 |
| Beaugosse | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 0 | 2 |
| | 60 | 2 | 2 | 2 |
| | 90 | 7 | 2 | 3 |
| | 120 | 7 | 2 | 3 |
| 314641 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 0 | 2 |
| | 60 | 2 | 2 | 2 |
| | 90 | 2 | 2 | 2 |
| | 120 | 3 | 2 | 2 |
| 973427 | 0 | 10 | 0 | 2 |
| | 30 | 10 | 0 | 2 |
| | 60 | 10 | 2 | 3 |
| | 90 | 10 | 2 | 3 |
| | 120 | 10 | 2 | 7 |
| 973349 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 0 | 0 | 2 |
| | 60 | 0 | 0 | 2 |
| | 90 | 0 | 0 | 2 |
| | 120 | 2 | 0 | 2 |

Annexe 10 : Résultats des prélèvements chez le chien, 10.11.2017, deuxième partie - étude de la reproductibilité

| | | | | |
|--------|-----|-----|----|----|
| 361586 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| | 30 | 7 | 0 | 2 |
| | 60 | 10 | 3 | 2 |
| | 90 | 10 | 3 | 3 |
| | 120 | 10 | 3 | 7 |
| 380846 | 0 | 2 | 2 | 2 |
| | 30 | 7 | 3 | 7 |
| | 60 | 7 | 3 | 7 |
| | 90 | 10 | 7 | 7 |
| | 120 | 10 | 7 | 7 |
| 763843 | 0 | 7 | 2 | 7 |
| | 30 | 10 | 3 | 10 |
| | 60 | 10 | 3 | 10 |
| | 90 | 10 | 7 | 10 |
| | 120 | 10 | 7 | 10 |
| 660610 | 0 | 10 | 7 | 10 |
| | 30 | 10 | 10 | 10 |
| | 60 | 10 | 10 | 10 |
| | 90 | 10 | 10 | 10 |
| | 120 | 10 | 10 | 10 |
| 759131 | 0 | 8,5 | 3 | 0 |
| | 30 | 8,5 | 7 | 7 |
| | 60 | 8,5 | 10 | 7 |
| | 90 | 8,5 | 10 | 10 |
| | 120 | 8,5 | 10 | 10 |
| 766905 | 0 | 7 | 2 | 0 |
| | 30 | 7 | 2 | 2 |
| | 60 | 10 | 3 | 7 |
| | 90 | 10 | 3 | 7 |
| | 120 | 10 | 7 | 7 |
| 730875 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| | 30 | 3 | 2 | 7 |
| | 60 | 7 | 3 | 7 |
| | 90 | 8,5 | 7 | 10 |
| | 120 | 10 | 7 | 10 |
| 393064 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | 30 | 2 | 2 | 3 |
| | 60 | 2 | 2 | 3 |
| | 90 | 2 | 2 | 7 |
| | 120 | 2 | 2 | 7 |

Annexe 11 : Résultats des prélèvements chez le cheval, bandelettes et écouvillons, 01.03.18,
première partie - étude de la répétabilité et de la reproductibilité

| 01/03/2018 | | bandelette | | écouvillon | |
|--------------|-----|------------|---|------------|---|
| A dix neuf | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| | 60 | 2 | 3 | 0 | 2 |
| | 90 | 2 | 3 | 0 | 2 |
| | 120 | 2 | 3 | 2 | 2 |
| Valentin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| | 60 | 2 | 3 | 0 | 2 |
| | 90 | 2 | 3 | 0 | 2 |
| | 120 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| Poésie | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 3 | 2 | 2 |
| | 60 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| | 90 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| | 120 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| Nougat | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 2 | 2 | 0 |
| | 60 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | 90 | 3 | 3 | 3 | 2 |
| | 120 | 3 | 3 | 3 | 2 |
| Une surprise | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 2 | 2 | 0 |
| | 60 | 2 | 2 | 3 | 2 |
| | 90 | 3 | 3 | 3 | 2 |
| | 120 | 3 | 3 | 3 | 2 |
| Lutin | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| | 30 | 3 | 3 | 0 | 0 |
| | 60 | 7 | 7 | 2 | 2 |
| | 90 | 7 | 7 | 2 | 2 |
| | 120 | 7 | 7 | 2 | 2 |
| Vasco | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | 60 | 3 | 3 | 2 | 3 |
| | 90 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | 120 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Cannabis | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 30 | 3 | 2 | 0 | 2 |
| | 60 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| | 90 | 3 | 3 | 2 | 3 |
| | 120 | 7 | 3 | 2 | 3 |

DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE DÉPISTAGE SALIVAIRE DE L'INFLAMMATION CHEZ LE CHIEN ET LE CHEVAL

NOM et Prénom : DEBONNE Clélia

Résumé :

La myéloperoxydase est une enzyme hémique des granules azurophiles des neutrophiles. Son mécanisme d'action est aujourd'hui bien connu et son implication dans de nombreuses maladies a été démontrée. Elle exerce une fonction antimicrobienne et joue un rôle essentiel au cours de l'inflammation et du stress oxydatif cellulaire. Son taux plasmatique augmente lors de maladies inflammatoires telles que les maladies cardiaques, rénales, auto immunes, lors d'infections ou lors d'un exercice intense chez le cheval et chez l'homme.

L'objectif de cette étude était d'évaluer la fiabilité d'un test salivaire de quantification de la MPO par réaction colorimétrique, en déterminant répétabilité et reproductibilité. Nous avons comparé quatre méthodes de prélèvements sur un groupe de 22 chiens et 16 chevaux, sains et au repos. La répétabilité et la reproductibilité du test ont été testées pour chaque méthode, en utilisant les graphiques de Bland et Altmann et le coefficient de Lin. La première méthode consiste à introduire la bandelette directement dans la bouche de l'animal, la frotter contre les gencives et lire le résultat ; la seconde et la troisième consistent à prélever la salive sur un écouvillon, puis à la diluer dans un petit tube contenant respectivement 300µL et 600µL de NaCl. Enfin la quatrième méthode consiste à prélever la salive sur un écouvillon, puis à l'étaler sur la bandelette avant de lire le résultat.

Cette étude montre que seule la quatrième méthode de prélèvement est répétable chez le chien mais aucune n'est reproductible. Chez le cheval, les quatre méthodes sont répétables mais aucune n'est reproductible. Le test évalué n'est pas suffisamment fiable et donc utilisable pour dépister l'inflammation systémique de manière précise dans ces deux espèces. La difficulté de quantifier précisément la salive prélevée, la possible interférence de l'hygiène buccale, sont deux éléments qui peuvent avoir mené à ces résultats.

Mots clés : MYELOPEROXYDASE, STRESS OXYDATIF, INFLAMMATION, SALIVE,
RÉPÉTABILITÉ, REPRODUCTIBILITÉ, CHIEN, CHEVAL

Jury :

Président : Professeur

Directeur : Docteur CLERO Delphine

Assesseur : Professeur ROBERT Céline

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR THE SALIVARY DETECTION OF INFLAMMATION IN DOGS AND HORSES

SURNAME: DEBONNE

Given name: Clélia

Summary:

Myeloperoxidase is a heme enzyme in azurophil granules of neutrophils. Its mechanism of action is well known today and its role in many diseases have been demonstrated. It has an antimicrobial function and plays an essential role during inflammation and cellular oxidative stress. Its plasma level increases during inflammatory diseases such as cardiac, renal or autoimmune diseases, infections or during intense exercise in horses and humans.

The aim of this study was to evaluate repeatability and reproducibility of a colorimetric, salivary test used to measure MPO. We compared four sampling methods on a group of 22 dogs and 16 horses, all healthy and at rest. The repeatability and reproducibility of the test were evaluated for each method, using Bland and Altmann graphs and Lynn's coefficient. The first method is to insert the tape directly into the animal's mouth, hit it against the gums and read the result; in the second and third tests, saliva sampled on a swab was diluted in a small tube respectively containing 300µL and 600µL of NaCl. Finally, the fourth method relied on saliva taken on a swab and then spread on the strip before reading the result.

This study shows that only the fourth method is repeatable but not reproducible in dogs. In horses, the four methods are repeatable but they are never reproducible. The test was used to screen systemic inflammation accurately in both species. The difficulty of accurately quantifying the saliva leavened and the possible interference of oral hygiene, are two elements that can have led to these results.

Keywords : MYELOPEROXYDASE, OXYDATIVE STRESS, INFLAMATION, SALIVA, REPEATABILITY, REPRODUCIBILITY.

Jury:

President: Professeur

Director: Doctor CLERO Delphine

Assessor: Professor ROBERT Céline