

Université de Montréal

**Évaluation de marqueurs plasmatiques de l'activation de la coagulation
chez des chats atteints de cardiomyopathie**

par

Christian Bédard

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences
en sciences vétérinaires
option pathologie

Août 2003



© Christian Bédard, 2003

SF

607

U54

2004

V.021

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Évaluation de marqueurs plasmatiques de l'activation de la coagulation chez
des chats atteints de cardiomyopathie

présenté par :
Christian Bédard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pierre Hélie, président-rapporteur
Anne Lanevschi, directrice de recherche
Marilyn Dunn, co-directrice
Bertrand Lussier, membre du jury

Résumé

Les chats atteints de cardiomyopathie (CM) sont prédisposés au thrombo-embolisme artériel (TEA). Le but de cette étude était de tester l'hypothèse que les chats atteints d'une CM ou de TEA démontrent une augmentation des taux plasmatiques de D-dimères et de complexes thrombine-antithrombine (TAT), deux marqueurs de la coagulation activée. Les concentrations de TAT et de D-dimères, l'activité de l'antithrombine III (ATIII), les temps de thromboplastine partielle activée (PTT) et de prothrombine (PT) ont été mesurés dans le plasma de 18 chats normaux, 23 chats avec une CM et 4 chats avec TEA. Chez les chats avec une CM, les associations des TAT, D-dimères, ATIII, PT et PTT avec le diamètre de l'oreillette gauche (OG) ainsi que le ratio entre le diamètre de l'oreillette gauche et le diamètre de l'aorte proximale (OG :Ao) ont été examinés. Les intervalles de référence pour les concentrations plasmatiques de TAT et D-dimères ont été établis à 2.0-20.0µg/L et 0.09-0.32 mg/mL respectivement. Les valeurs médianes de TAT, D-dimères, ATIII, PT et PTT ne différaient pas significativement entre les groupes et n'étaient pas corrélés avec les mesures de OG ou OG :Ao chez les chats avec une CM. Ces résultats indiquent que les taux de D-dimères et de TAT n'ont pas permis de détecter un état d'hypercoagulabilité dans la majorité des chats avec CM de cette étude. Cependant, certains chats avec CM ou TEA avaient des niveaux élevés de TAT et de D-dimères démontrant la présence d'un état d'hypercoagulabilité.

Mots-clés : Cardiomyopathie, hypercoagulabilité, thrombo-embolisme, félin, coagulation, d-dimère, complexe thrombine-antithrombine, antithrombine III.

Abstract

Cats with primary myocardial disease are predisposed to arterial thromboembolism (ATE) of cardiac origin. The purpose of this study was to test the hypothesis that cats with primary cardiomyopathy have elevated plasmatic levels of D-dimer and thrombin-antithrombin complexes (TAT), two plasmatic markers of activated coagulation. Levels of TAT and D-dimer, antithrombin III activity (ATIII), prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (PTT) were evaluated in the plasma of 18 healthy cats, 23 cats with CM and 4 cats with ATE. In cats with CM, the associations between left atrial diameter (LA) and left atrial to proximal aortic diameter ratio (LA:Ao) with TAT, D-dimer, ATIII, PT and PTT were evaluated. The reference ranges for D-dimer and TAT in plasma of healthy cats were established between 0.09-0.32 $\mu\text{g/mL}$ and 2.0-20.0 μL respectively. Median values of TAT, D-dimer, ATIII and PT were not significantly different between groups. Plasma TAT, D-dimer, ATIII, PT and PTT were not significantly correlated with LA or LA:Ao. These results indicate that TAT and D-dimer plasma levels did not demonstrate a hypercoagulable state in the majority of the cats with CM included in this study. High concentrations of D-dimer and TAT were present in the plasma of some cats with CM and ATE, indicating an activated coagulation.

Keywords : Cardiomyopathy, hypercoagulability, thromboembolism, cat, coagulation, D-dimer, thrombin-antithrombin complex, antithrombin III.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures	ix
Liste des sigles et abréviations.....	xi
Dédicace.....	xii
Remerciements.....	xiii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE PREMIER: RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	6
1. Thrombose et état préthrombotique : définitions.....	7
2. Coagulation normale.....	8
2.1. Initiation de la coagulation.....	8
2.2. Mécanismes de contrôle de la coagulation.....	10
2.2.1. <i>Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI)</i>	10
2.2.2. <i>Antithrombine III (ATIII)</i>	11
2.2.3. <i>Système protéine C et protéine S</i>	12
2.2.4. <i>Fibrinolyse</i>	12

3. Pathogénie de la thrombose	13
3.1. Lésions endothéliales	14
3.2. Altérations du flux sanguin (facteurs hémorrhéologiques).....	16
3.3. Hypercoagulabilité	16
4. Détection de l'état préthrombotique et de la thrombose	18
4.1. Peptides d'activation	18
4.2. Complexes facteurs et inhibiteurs	20
4.3. Marqueurs de la fibrinolyse	20
4.4. Autres marqueurs	21
5. Thrombo-embolisme félin	22
5.1. Généralités.....	22
5.2. Pathogénie des TEA félines	23
6. Marqueurs de la coagulation et maladie cardiaque	24
CHAPITRE DEUXIÈME : ARTICLE	26
Activated coagulation markers in the plasma of healthy cats and cats with primary myocardial disease.	
Christian Bédard DMV ⁽¹⁾ , Anne Lanevski- Pietersma DMV MSc ⁽¹⁾ Marilyn Dunn DMV, MSc ⁽²⁾	
Département de pathologie et de microbiologie ⁽¹⁾ , Département des sciences cliniques ⁽²⁾ , Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6.	
Soumis à: Journal of Veterinary Internal Medicine, Juin 2003	
Abstract	27
Introduction	28
Material and methods	31
Results	35
Discussion	37
References	43
List of figures and figures	48
Tables	57

CHAPITRE TROISIÈME: DISCUSSION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS ET CONCLUSION..... 60

BIBLIOGRAPHIE 66

Liste des tableaux

Chapitre deuxième

Table I - Intra-assay coefficient of variation (CV) for D-dimer and TAT assays.

Table II - Coagulation parameters of healthy cats, cats with cardiomyopathy and cats with arterial thromboembolism.

Table III - Spearman's correlation coefficients between echocardiographic findings (LA and LA: Ao) and coagulation parameters in cats with cardiomyopathy.

Liste des figures

Chapitre premier

Figure 1. Voie d'activation de la cascade de la coagulation jusqu'à l'activation de la thrombine.

Figure 2. Voie finale de la cascade de la coagulation avec conversion de la prothrombine en thrombine par le complexe prothrombinase et conversion du fibrinogène en fibrine par la thrombine.

Figure 3. Principaux sites d'action des inhibiteurs plasmatiques de la coagulation.

Figure 4. Triade de Virchow : pathogénie de la thrombose.

Chapitre deuxième

Figure 1 – D-dimer concentration distribution in plasma of 17 healthy cats with superimposed normal distribution curve.

Figure 2 – TAT concentration distribution in plasma of 18 healthy cats.

Figure 3 – D-dimer plasma concentration in healthy cats, cats with cardiomyopathy (CM) and cats with arterial thromboembolism (ATE) ($p=0.110$).

Figure 4 – Thrombin-antithrombin complex (TAT) plasma concentration in healthy cats, cats with cardiomyopathy (CM) and cats with arterial thromboembolism (ATE) ($p=0.135$).

Figure 5 – Antithrombin III plasma activity in healthy cats, cats with cardiomyopathy (CM) and cats with arterial thromboembolism (ATE) ($p=0.107$).

Figure 6 – Prothrombin time in healthy cats, cats with cardiomyopathy (CM) and cats with arterial thromboembolism (ATE) ($p=0.111$).

Figure 7 – Left atrial diameter of healthy cats, cats with cardiomyopathy (CM) and cats with arterial thromboembolism (ATE) (* $p=0.0012$).

Figure 8 – Left atrial: proximal aorta diameter ratio (LA:Ao) in healthy cats, cats with cardiomyopathy (CM) and cats with arterial thromboembolism (ATE) (* $p=0.002$). The horizontal dashed line indicates the upper limit of the reference range for LA:Ao ratio set at 1.5 in healthy cats.

Liste des sigles et abréviations

- Ao : diamètre de l'aorte proximale
- PTT : temps de thromboplastine partielle activée
- ATIII : antithrombine III
- CIVD : coagulation intravasculaire disséminée
- CM : cardiomyopathie
- CMH : cardiomyopathie hypertrophique
- ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*
- F1+2 : fragment prothrombine 1+2
- FDPs : produits de dégradation du fibrinogène
- FPA : fibrinopeptide A
- FPB : fibrinopeptide B
- fT : facteur tissulaire
- OG : diamètre de l'oreillette gauche
- PAI-1 : inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1
- PC : protéine C
- PS : protéine S
- PT : temps de prothrombine
- TAT : complexe thrombine-antithrombine
- TEA : thrombo-embolisme artériel
- TM : thrombomoduline
- t-PA : activateur tissulaire du plasminogène
- TPFI : *tissue factor pathway inhibitor*; inhibiteur de la voie du facteur tissulaire

Dédicace

*À Charlotte et Camille,
Qui depuis les premiers moments m'ont supporté,*

*Et à toi Gabrielle,
Qui occupe déjà tant nos pensées.*

Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord à ma directrice de résidence et de maîtrise, Dre Anne Lanevski-Pietersma, pour son intérêt pour la pathologie clinique vétérinaire, sa disponibilité tout au long de mon apprentissage comme résident et surtout pour son support scientifique et ses encouragements toujours sans limite,

À ma co-directrice, Dre Marilyn Dunn, pour avoir initié ce projet, pour sa collaboration tout au long de sa réalisation et plus particulièrement lors de la collecte des données, et finalement pour son enthousiasme que rien ne semble vouloir ralentir,

Au Dr Rocky DiFruscia et Dre Mylène Taillefer pour leur collaboration, particulièrement les nombreuses échographies cardiaques effectuées si gentiment,

À madame Anik Cormier du laboratoire de coagulation du Service d'hématologie/oncologie de l'Hôpital Sainte-Justine, pour son support technique,

À M. Guy Beauchamp pour ses très nombreux conseils avisés et judicieux lors des analyses statistiques,

Aux nombreux propriétaires de chats qui ont si gentiment participé à ce projet; sans leur désir d'améliorer le bien-être de leur animal, ce projet n'aurait jamais été possible.

Finalement, je remercie le Fonds du Centenaire de la Faculté de Médecine Vétérinaire ainsi que l'Académie de Médecine Vétérinaire du Québec qui ont assuré le financement de ce projet.

Introduction

Chez le chat, la présence d'une maladie primaire du myocarde est associée à un risque très élevée de thrombo-embolisme artériel (TEA) (Laste et Harpster 1995, Fox 1999, Rodriguez et Harpster 2002). Une étude rétrospective portant sur des cas de cardiomyopathie hypertrophique (CMH) féline a rapporté que près de 33% des chats avaient développé un TEA durant la durée du suivi (Rush et al. 2002). De ce fait, les TEA représentent la principale cause de mortalité ou d'euthanasie des chats atteints d'une CMH (Rush et al 2002).

La pathogénie des TEA félines se résume par la présence d'une modification du flux sanguin normal, de lésions à la surface de l'endothélium vasculaire et d'une hypercoagulabilité héréditaire possible dans de rares cas (Fox 2000 a). Chez le chat souffrant d'une CMH, la dysfonction diastolique résultant de l'hypertrophie du ventricule gauche cause une dilatation parfois sévère de l'oreillette gauche puis éventuellement de l'œdème pulmonaire et une insuffisance cardiaque congestive (Lord et al 1974, Fox 1999). Des lésions de fibroplasie sont fréquentes dans l'endocarde (Tilley et al 1977). L'exposition du collagène sous-endothélial et du facteur tissulaire activent ensuite l'adhésion plaquettaire et la cascade de la coagulation (Fox 2000 a). La circulation sanguine est altérée au niveau des chambres cardiaques en raison de la faible contractilité du myocarde, de la dilatation de l'oreillette gauche et de la présence de régurgitation mitrale parfois présente (Tilley et al 1975, Fox 1999). Ces changements hémodynamiques provoquent une stase sanguine et des foyers de turbulence dans l'oreillette gauche. La

turbulence entraîne des lésions directes à l'endothélium et active les plaquettes alors que la stase empêche l'apport plasmatique de facteurs inhibiteurs de la coagulation et permet également la croissance éventuelle d'un thrombus (Jobin 1995).

Depuis quelques années, de nombreux marqueurs de l'activation de la coagulation et de la fibrinolyse ont été découverts (Wada et al 1992, Tripodi 1996, Bick 1998, Wada et al 1999, Becker 2001). En médecine humaine, plusieurs de ces marqueurs sont utilisés pour détecter le statut préthrombotique chez des patients atteints de maladies cardiaques (Ikeda et al 1997, Fareed et al 1998). Chez les patients atteints de sténose mitrale, une diminution du taux d'antithrombine III (ATIII) a été associée au développement d'un thrombus cardiaque alors qu'une élévation du taux de D-dimères était associée à la présence d'un thrombus mobile (Yasaka et Beppu 1993). Une autre étude a également rapporté des taux plasmatiques de fibrinopeptide A (FPA) et de complexe thrombine-antithrombine (TAT) significativement augmentés lors de cardiomyopathies hypertrophiques ou dilatées comparativement aux sujets normaux (Yamamoto et al 1995). De plus, les taux plasmatiques de D-dimères étaient également augmentés lors de cardiomyopathies dilatées (Yamamoto et al 1995). Les taux plasmatiques de FPA et de TAT étaient corrélés avec le diamètre de l'oreillette gauche lors de cardiomyopathie hypertrophique (Yamamoto et al 1995). Les résultats de cette étude indiquaient que l'activation de la coagulation survenait secondairement à la dilatation de l'oreillette gauche chez les patients atteints d'une CMH (Yamamoto et al 1995). Le risque de thrombo-

embolisme chez les patients avec des niveaux élevés de marqueurs de l'activation de la coagulation n'a toutefois pas été évalué de façon prospective (Lip 1995).

Les TAT et les D-dimères sont des marqueurs moléculaires de l'activation de coagulation qui méritent d'être évalués chez les chats avec des maladies cardiaques. Les TAT sont des marqueurs très sensibles de la thrombinoformation. Durant la coagulation, la thrombine libre se lie rapidement à l'ATIII. Conséquemment, le taux d'ATIII diminue et des TAT sont détectés dans le plasma. La trousse de dosage pour les TAT humains démontre une bonne réactivité croisée avec plusieurs espèces animales (Ravanat et al 1995). Elle a été utilisée pour la détermination des niveaux de TAT chez des chevaux normaux et des chevaux avec coliques (Topper et al 1996, Topper et al 1996). Les D-dimères sont les produits terminaux de la digestion de la fibrine par la plasmine. Ils sont utilisés comme marqueurs de la déposition de la fibrine et de la fibrinolyse chez l'homme (Bick 1995, Bounameaux et al 1991, Bounameaux et al 1997, Fareed et al 1998). Des épreuves immunoturbidimétriques et d'agglutination de particules de latex ont par ailleurs été validées chez le chien pour le diagnostic de la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) (Calin et al 2000, Stokol et al 2000).

Le but de cette étude était de tester l'hypothèse que la coagulation est activée chez les chats atteints d'une CM et chez les chats avec TEA et que l'activation de la coagulation est associée à une dilatation de l'oreillette gauche. Les D-dimères et les TAT furent utilisés comme marqueurs de l'activation de la coagulation.

Pour tester cette hypothèse, les objectifs de l'étude étaient les suivants: 1) établir des valeurs de référence pour la concentration de TAT et de D-dimères dans le plasma de chats en santé, 2) mesurer et comparer la concentration de TAT, la concentration de D-dimères, l'activité de l'ATIII, les temps de prothrombine (PT) et de thromboplastine partielle activée (PTT) dans le plasma de chats en santé, de chats avec CM et de chats avec TEA, et 3) évaluer le niveau d'association entre des mesures de la dimension de l'oreillette gauche (diamètre de l'oreillette gauche et le rapport diamètre de l'oreillette gauche sur le diamètre de l'aorte proximale) et les différents marqueurs de la coagulation chez les chats avec CM.

Chapitre premier

Recension de la littérature

1. Thrombose et état préthrombotique : définitions

Chez l'homme, les affections thrombotiques et thrombo-emboliques sont associées à de nombreuses conditions telles que CIVD, thrombo-embolisme pulmonaire, thrombose des veines profondes, infarctus du myocarde et thrombo-embolisme cérébral (Jodin 1995). La *thrombose* découle d'une activation inappropriée et exagérée des mécanismes de l'hémostase qui surpasse les mécanismes physiologiques de protection (Jodin 1995, Darien 2000). De cette activation résulte la déposition d'un agrégat fibrinoplaquettaire attaché à l'endothélium, obstruant partiellement ou complètement la lumière vasculaire. Un *thrombo-embolisme* peut ensuite survenir si le thrombus ou un fragment de celui-ci se détache de la paroi du vaisseau et migre en aval pour se loger éventuellement dans un vaisseau de plus petit calibre (Jobin 1995).

Un déséquilibre entre les *mécanismes d'activation* de l'hémostase et les *mécanismes de protection* contre la thrombose résulte en un état d'*hypercoagulabilité* qui favorise l'établissement d'un *état préthrombotique* associé à un risque élevé de thrombose (Bauer et Rosenberg 1987, Mannucci et Grande 1992). Tel que défini par Mannucci et Grande (1992), un état préthrombotique se caractérise par une hypercoagulabilité sans présence de manifestation clinique de thrombose ou de déposition inappropriée de fibrine.

2. Coagulation normale

2.1. Initiation de la coagulation

La coagulation normale consiste en une série de réactions enzymatiques impliquant l'activation séquentielle de protéases plasmatiques présentes sous la forme de zymogènes inactifs (Furie et Furie 1992, Jobin 1995). L'activation de la coagulation est essentiellement assurée par la présence du facteur tissulaire (fT) qui agit comme le principal initiateur de la cascade de la coagulation en activant spécifiquement la voie extrinsèque (figure 1) (Furie et Furie 1992, Wada et al 1995, Roncalès et Sancho 2000).

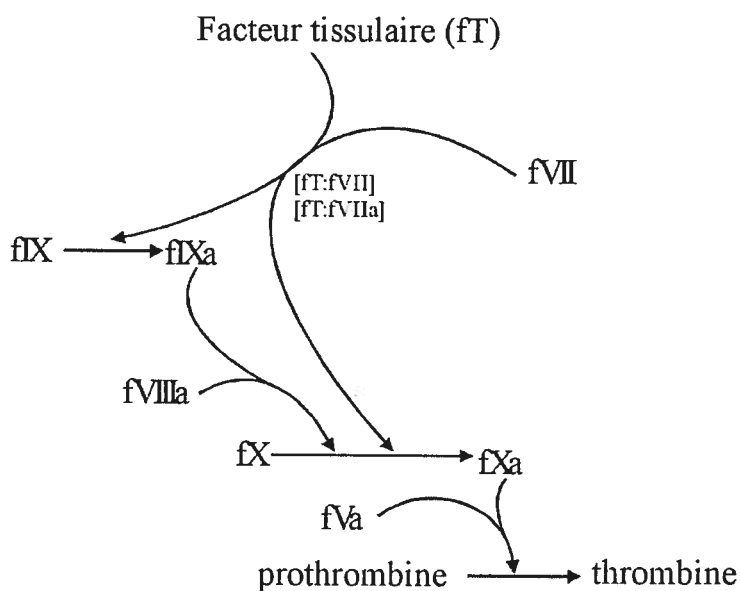


Figure 1. Voie d'activation de la cascade de coagulation jusqu'à l'activation de la thrombine. Les facteurs de coagulation sont identifiés par un chiffre romain précédé de la lettre « f »; la lettre « a » est utilisée pour identifier les facteurs qui ont été activés.

Le fT est une glycoprotéine trans-membranaire présente seulement au niveau des couches sous-endothéliales des vaisseaux sanguins normaux et qui est absente de la surface de l'endothélium vasculaire intact (Wada et al 1995, Jobin 1995). Lors de dommages vasculaires, les tissus sous-endothéliaux sont exposés et le fT déclenche la coagulation en se liant spécifiquement au fVII ou au fVIIa (Nemerson 1988, Wada et al 1995, Jobin 1995). Le complexe fT:fVII ou fT:fVIIa active le fX de la voie commune et le fIX de la voie intrinsèque de la coagulation. Une fois activé, le fXa initie la voie commune de la coagulation.

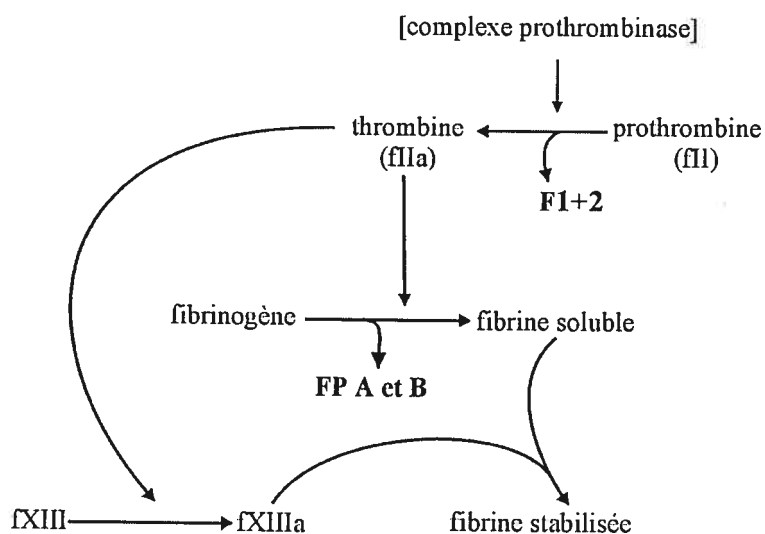


Figure 2. Voie finale de la cascade de la coagulation avec conversion de la prothrombine en thrombine par le complexe prothrombinase et conversion du fibrinogène en fibrine par la thrombine. F1+2 : fragment prothrombine 1+2; FP A et B : fragment fibrinopeptide A et B.

Le *complexe prothrombinase*, composé du fXa, du fVa, de Ca^{2+} et de phospholipides membranaires, catalyse la transformation de la prothrombine en thrombine et la libération d'un peptide d'activation inactif, le fragment prothrombine F1+2 (figure 2). La conversion du fibrinogène est ensuite catalysée par l'action de la thrombine qui libère les monomères de fibrine et les fibrinopeptides A et B (FPA et FPB) (figure 2). La thrombine active également le facteur XIII dont le rôle est de stabiliser le caillot par l'établissement de liens covalents entre les monomères de fibrine (figure 2) (Jobin 1995).

2.2. Mécanismes de contrôle de la coagulation

En absence de mécanismes de contrôle, l'activation de la coagulation pourrait mener à la formation excessive de thrombine et ainsi à la thrombose. Trois mécanismes inhibiteurs de la coagulation sont actuellement connus et impliquent la présence d'anticoagulants plasmatiques naturels : *l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire* (TFPI), *l'antithrombine III* (ATIII) et le système *protéine C/protéine S* (figure 3).

2.2.1. Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI)

L'activation directe du fX par le complexe fT:fVIIa est rapidement supprimée par le TFPI (Broze 1995). Le TFPI est une glycoprotéine plasmatique qui circule en faible concentration, principalement liée à des lipoprotéines (Broze 1995). Après l'administration d'héparine *in vivo*, les concentrations de TFPI augmentent de 2 à 4 fois, suggérant la

présence de TFPI également lié à la surface des cellules endothéliales (Hoppensteadt et al. 1995, Broze 1995).

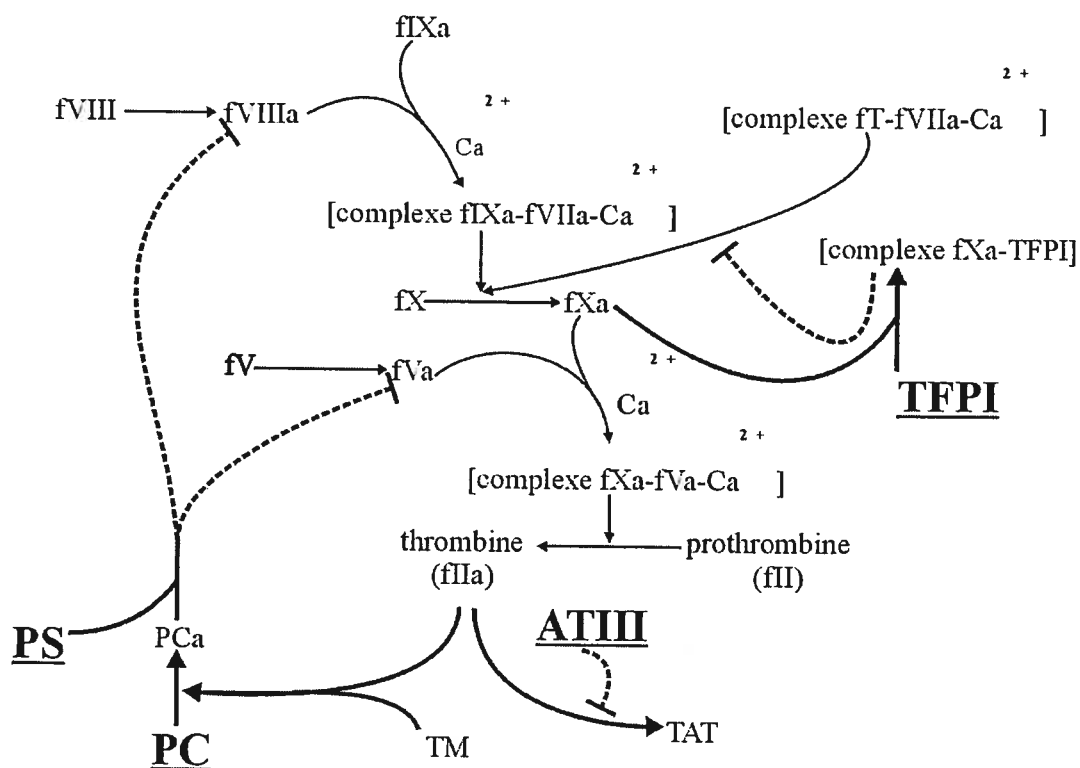


Figure 3. Principaux sites d'action des inhibiteurs plasmatiques de la coagulation. TPFI : inhibiteur de la voie du facteur tissulaire, ATIII : antithrombine III, PC : protéine C, PS : protéine S, TAT : complexe thrombine-antithrombine III, TM : thrombomoduline, fT : facteur tissulaire. Les traits pointillés indiquent une fonction d'inhibition.

2.2.2. Antithrombine III (ATIII)

L'ATIII est une glycoprotéine synthétisée par le foie et qui appartient à la famille des sérine-protéases (Johnstone 2000). C'est le principal inhibiteur plasmatique de la

thrombine ainsi que du fXa. L'ATIII se lie à la thrombine pour former un complexe thrombine-antithrombine (TAT) inactif (Johnstone 2000). L'activité de l'ATIII est grandement stimulée par la présence d'héparine ainsi que par les molécules d'héparan sulfate présentes à la surface des cellules endothéliales des petits vaisseaux sanguins (Johnstone 2000). Une diminution de l'activité de l'ATIII est associée avec un risque élevé de thrombose (Johnstone 2000).

2.2.3. *Système protéine C et protéine S*

Le système protéine C/protéine S est un mécanisme important de contrôle de la coagulation (Esmon 2000, Johnstone 2000). En se liant à la thrombomoduline localisée à la surface des cellules endothéliales, la thrombine active la protéine C qui se lie ensuite à la protéine S (agissant comme cofacteur). Le complexe protéine C/protéine S inactive ensuite les fVa et fVIIIa (Esmon 2000). Chez l'humain, une déficience du système protéine C/protéine S est également associée à des risques de thromboses (Jobin 1995). Chez le cheval en colique, une diminution du taux plasmatique de protéine C a été rapportée suggérant la consommation des mécanismes de contrôle de la coagulation (Prasse, Topper et al 1993).

2.2.4. *Fibrinolyse*

En plus d'initier la coagulation, les dommages à l'endothélium provoquent également la libération de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) (Jobin 1995). L'activation de la plasmine par le t-PA et le facteur XIIa résulte en une activation de la

fibrinolyse (Jobin 1995, Darien 2000, Lip 2000). La plasmine activée scinde le fibrinogène et les monomères de fibrine, et forme les fragments X, Y, D et E (produits de dégradation du fibrinogène/fibrine; FDPs) (Jobin 1995). La plasmine agit également sur les polymères de fibrine stabilisés, libérant notamment les FDPs et fragments D-dimères (Jobin 1995). Des inhibiteurs plasmatiques participent au contrôle du système fibrinolytique. L' α_2 -antiplasmine est le principal inhibiteur de la plasmine alors que l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 (PAI-1) est le principal inhibiteur du t-PA. De façon expérimentale, une diminution importante de l' α_2 -antiplasmine a été notée dans un modèle canin de choc endotoxémique (Aassen et al 1978). Chez les chevaux en colique, une diminution de l'activité du plasminogène et de l' α_2 -antiplasmine a également été notée (Prasse, Topper et al 1993). Des épreuves chromogéniques pour le dosage du t-PA, du plasminogène, du PAI et de l' α_2 -antiplasmine ont également été validées chez le chien (Lanevschi et al 1996).

3. Pathogénie de la thrombose

La pathogénie de la thrombose a été décrite pour la première fois il y a plus d'un siècle par le pathologiste et médecin allemand Rudolf Virchow (Slauson 2002). Il a identifié trois facteurs responsables d'un déséquilibre entre les mécanismes thrombogènes et inhibiteurs. Ces facteurs sont les *dommages endothéliaux*, *l'altération du flux sanguin* et

l'*hypercoagulabilité plasmatique*, aujourd'hui regroupés sous la dénomination de *triade de Virchow* (figure 4) (Darien 2000, Jobin 1995, Slauson 2002, Mitchell et Cotran 1999).

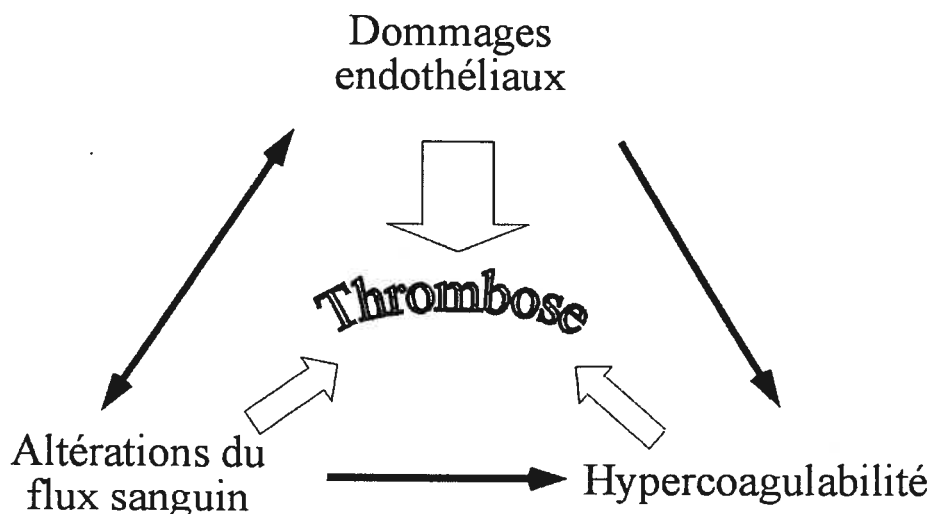


Figure 4: Triade de Virchow : pathogénie de la thrombose. Les dommages endothéliaux, l'altération du flux sanguin et l'hypercoagulabilité sont les trois principaux facteurs favorisant le développement d'un état préthrombotique et de la thrombogénèse.

3.1. Lésions endothéliales

Une activation endothéliale ou des lésions aux cellules endothéliales donnent des caractéristiques thrombogènes à la paroi vasculaire (Jobin 1995). La présence de lésions à l'endothélium vasculaire est d'ailleurs un facteur prépondérant dans la thrombogénèse, particulièrement décisif lors de thrombose artérielle ou cardiaque (Jobin 1995). L'activation endothéliale peut survenir lors d'une perte d'intégrité vasculaire, en présence de certaines cytokines, d'endotoxines ou lors d'expression de molécules d'adhésion à la

surface des leucocytes sanguins (de Gopegui et Navarro 2000, Bannerman et Goldblum 1999). Elle favorise la synthèse de fT par les cellules endothéliales.

Les lésions à l'endothélium vasculaire exposent la matrice sous-endothéliale thrombogène et activent l'expression de substances procoagulantes par les cellules endothéliales intactes. La matrice sous-endothéliale contient notamment le collagène de type III qui est particulièrement thrombogène et auquel les plaquettes vont adhérer. Le fT présent dans la matrice sous-endothéliale est exposé et active la cascade de la coagulation.

La disparition de cellules endothéliales intactes à la surface vasculaire limite le fonctionnement des mécanismes de contrôle qui y sont normalement présents (de Gopegui et Navarro 2000). L'apparition de lésions vasculaires est associée à la perte de thrombomoduline, normalement localisées à la surface des cellules endothéliales, ce qui diminue l'efficacité du système protéine C/protéines S au sein même de la paroi vasculaire (Wada et al 1995; de Gopegui et Navarro 2000). L'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 (PAI-1) est également libéré par les cellules endothéliales activées, ce qui inhibe localement la fibrinolyse et permet la croissance d'un thrombus en formation (Jodin 1995, de Gopegui et Navarro 2000, Wada et al 1993). Chez l'homme, on a démontré une élévation de la concentration plasmatique de TM et de PAI-1 chez des patients atteints de CIVD, ce qui suggérerait la présence de lésions vasculaires extensives (Wada et al 1993, Wada et al 1995).

3.2. Altérations du flux sanguin (facteurs hémorrhéologiques)

Normalement, le flux sanguin est laminaire et les plaquettes ainsi que les autres éléments cellulaires sanguins circulent dans le centre des vaisseaux, séparées ainsi de la paroi endothéliale par une mince couche de plasma pauvre en plaquettes (Jobin 1995). La stase et la turbulence sanguine altèrent le flux laminaire normal. La turbulence sanguine cause directement des lésions à l'endothélium et permet la formation de petites zones de stase sanguine (Jobin 1995). La turbulence favorise les interactions entre les plaquettes et entre les plaquettes et les cellules endothéliales; l'adhésion et l'agrégation plaquettaire sont alors favorisées et le risque de thrombose apparaît (Jobin 1995). La stase sanguine favorise la thrombose en empêchant la dilution des facteurs activés de la coagulation et l'apport en inhibiteurs plasmatiques (Jobin 1995). Elle survient au niveau des veines de gros calibres et plus particulièrement au niveau des chambres cardiaques dilatées ou démontrant une contraction anormale.

3.3. Hypercoagulabilité

Chez l'homme, des déficiences héréditaires en anticoagulants naturels (ATIII, protéine C ou protéine S) sont associées à des risques élevés de thromboses veineuses (Schafer 1985, Jobin 1995). Une résistance du facteur Va à son inhibition par la protéine C activée est également associée à un risque récurrent de thrombose (Simioni et al 1997, Jobin 1995). Parmi les autres causes héréditaires d'hypercoagulabilité chez l'homme, il y a

les déficiences en protéine C et protéine S, des désordres fibrinolytiques, l'hyperhomocystéinémie et également des cas rares de dysfibrinogénémie et des déficits sévères du facteur XII (Schafer 1985, Jobin 1995, Welch et Loscalzo 1998). Outre la déficience en facteur XII chez le chat domestique, les causes héréditaires d'hypercoagulabilité sont très peu rapportées en médecine vétérinaire (Giger 2000).

Parmi les causes acquises, il y a des déficits d'ATIII et de protéine C associés à une diminution de synthèse (maladie hépatique) ou une perte excessive (syndrome néphrotique avec protéinurie) (Jodin 1995, Carr et Johnston 1994). Chez l'homme, une augmentation du risque de thrombose est également associée au diabète sucré, au syndrome anti-phospholipides, à l'insuffisance cardiaque, aux maladies cardiaques valvulaires, à l'immobilisation prolongée et aux cancers disséminés (Wada et al 1992, Lip et Gibbs 1999, Rocha et al 1989). En médecine vétérinaire, des cas de thromboses ont également été associés à des maladies infectieuses, au syndrome néphrotique, aux dilatations et torsions gastriques, à des infestations par le ver du cœur, à des lésions tissulaires extensives, à des complications obstétricales, à des maladies à médiation immunitaire, à des néoplasmes et à la présence de cathéters intraveineux (Carr et Johnson 1994, Darien 2000). Chez le chat, les thrombo-embolismes artériels (TEA) sont des complications fréquentes des cardiomyopathies (Laste et Harpster 1995, Rodriguez et Harpster 2002).

4. Détection de l'état préthrombotique et de la thrombose

Une compréhension approfondie des mécanismes biochimiques de la coagulation a permis le développement de marqueurs moléculaires qui sont sensibles et spécifiques de l'activation de la coagulation (Boicclair et al 1990, Mannucci et Giangrande 1992). Des tests de laboratoire utilisant ces marqueurs sont maintenant disponibles et permettent d'identifier les patients à risque de thrombose. L'identification de ces patients a évidemment une utilité clinique certaine dans la prévention et le traitement des maladies thrombotiques. Les principaux marqueurs actuellement étudiés sont les *peptides d'activation*, les *complexes enzymes-inhibiteurs* et les *produits de dégradation de la fibrine/fibrinogène*.

4.1. Peptides d'activation

Un peptide d'activation est un fragment libéré soit à partir d'un zymogène lors de son activation ou soit à partir du fibrinogène lors de sa conversion en fibrine par la thrombine (Mannucci et Grande 1992). Le dosage d'un peptide d'activation est une approche qui est utilisée pour mesurer indirectement l'activité d'un facteur de la coagulation. Cette approche a été rapportée par Nossel et collaborateurs qui ont innové en développant une méthode sensible pour le dosage du FPA il y a près de 30 ans (Nossel et al 1974). Le FPA est un petit peptide de 16 acides aminés, libéré de la chaîne alpha du fibrinogène lors de sa conversion en fibrine et est un indicateur indirect de l'activité de la

thrombine (Tripodi et Mannucci 1996). Cette molécule possède une courte demi-vie plasmatique d'environ 3 à 5 minutes (Roncalès et Sancho 2000). Une trousse de dosage immunologique est disponible commercialement ⁽¹⁾. Une élévation de la concentration plasmatique de FPA a été associée à la CIVD, à certaines maladies cardiaques ainsi qu'à la présence de plusieurs désordres de l'hémostase (Bick 1995, Yamamoto et al 1995, Tsai et al 1998, Arkel et al 2002). En médecine vétérinaire, la trousse de dosage a permis de détecter des FPA dans le plasma de souris, chien, cochon, mouton et babouins (Ravanat et al 1995).

La conversion de la prothrombine en thrombine libère le fragment F1+2. Ce fragment est un indicateur de la thrombinoformation et de l'activité du complexe prothrombinase (Tripodi et Mannucci 1996). Le F1+2 est un peptide de 273 acides aminés ayant une demi-vie d'environ 90 minutes (Roncalès et Sancho 2000). Une technique de dosage utilisant une méthode ELISA est également disponible commercialement ⁽²⁾. Chez l'homme, une élévation de la concentration de F1+2 a été associée à la CIVD ainsi qu'à la présence de plusieurs maladies de l'hémostase héréditaires ou acquises (Bauer et Rosenberg 1987, Bick 1995, Arkel et al 2002). La trousse commerciale a démontré très peu de sensibilité pour le F1+2 de plusieurs espèces animales (rat, souris, poule, cochon d'inde, chien, cochon et mouton); ces résultats suggèrent une absence de réaction entre les F1+2 de ces animaux et les anticorps anti-F1+2 humains (Ravanat et al 1995).

⁽¹⁾ *Asserchrom FPA, Diagnostica Stago, Asnières-sur Seine, France.*

⁽²⁾ *Enzygnost™ F1+2, Dade Behring, Marburg, Allemagne.*

4.2. Complexes facteurs et inhibiteurs

L'inhibition de la thrombine par l'ATIII entraîne la formation d'un complexe thrombine-ATIII inactif. Une fois formés, les TAT sont présents dans le sang pour approximativement 15 minutes et sont ensuite éliminés par les macrophages (Roncalès et Sancho 2000). Une technique de dosage immunologique utilisant une méthode ELISA sandwich est disponible commercialement⁽³⁾. En médecine vétérinaire, le dosage des TAT a été validé chez les chevaux et utilisé pour évaluer l'activation de la coagulation chez les chevaux présentés avec des manifestations de coliques (Topper et al 1996); les formes les plus sévères de coliques étaient associées avec une augmentation importante de la concentration de TAT plasmatique (Topper et Prasse 1996). La trousse commerciale humaine a également démontré une bonne réaction croisée pour les TAT plasmatiques de souris, rats, cochon d'inde, chien, cochon et babouin (Ravanat et al 1995).

4.3. Marqueurs de la fibrinolyse

En médecine vétérinaire, les enzymes de la voie de la fibrinolyse ont été étudiées principalement chez le cheval et le chien. De façon expérimentale, une diminution importante de l' α_2 -antiplasmine a été notée dans un modèle canin de choc endotoxémique (Aassen et al 1978). Chez les chevaux en colique, une diminution des taux de α_2 -antiplasmine a également été notée (Prasse et al 1993)

⁽³⁾ *Enzygnost*® TAT, Dade Behring, Marburg, Allemagne.

Les *D-dimères* sont des marqueurs de l'activation de la fibrinolyse. Une fois activée, la plasmine libère le fragment D-dimère à partir de la fibrine qui a été stabilisée par les liens covalents. Les D-dimères peuvent être détectés et mesurés dans le plasma à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre des épitopes uniques aux D-dimères (Bounameaux et al 1994, Lip et Lowe 1995, Bounameaux et al 1997). Les différents tests couramment utilisés en médecine humaine font appel à des techniques ELISA, d'immunoturbidimétrie ou d'agglutination de particules de latex. Chez l'homme, le dosage des FDP a été remplacé par le dosage des D-dimères plasmatiques en raison d'une sensibilité et spécificité supérieures. Plusieurs études ont démontré l'utilité du dosage des D-dimères dans l'approche diagnostique de désordres hémostatiques chez l'humain tels que la CIVD, les thrombo-embolismes pulmonaires (TEP) et les thromboses des veines profondes (TVP) (Bick et al 1995, Bounameaux et al 1994, Bounameaux et al 1997). Le dosage des D-dimères plasmatiques peut également être utilisé comme test de dépistage pour les patients à risques d'embolisation artérielle (Lipp et Lowe 1995). Des épreuves immunoturbidimétriques et d'agglutination de particules de latex pour le dosage des D-dimères ont été validées chez le chien comme outils diagnostique de la CIVD (Calin et al 2000, Stokol et al 2000).

4.4. Autres marqueurs

Plusieurs autres peptides d'activation, complexe enzymes-inhibiteurs et marqueurs de la fibrinolyse ont été développés chez l'homme (Bick 1995, Tripodi et Mannucci 1996,

Fareed et al 1998), mais très peu d'entre eux ont été évalués jusqu'à maintenant chez les animaux dans un contexte clinique.

5. Thrombo-embolisme félin

5.1. Généralités

Chez les chats, les thromboses cardiaques et les thrombo-embolismes artériels (TEA) sont des complications graves des cardiomyopathies (Laste et Harpster 1995, Fox dans Fox). Les TEA représentent la principale cause de mortalité chez les chats atteints de cardiomyopathie hypertrophique (Rush et al 2002). Dans une importante étude rétrospective sur la CMH féline, près de 33% des chats avaient développé au moins un épisode de TEA au cours du suivi (Rush et al 2002). De plus, la très grande majorité des chats présentés avec des signes de TEA ont une cardiomyopathie hypertrophique au moment du diagnostic (Laste et Harpster 1995).

La majorité des thromboses se développe au niveau des chambres cardiaques gauches et plus particulièrement à l'intérieur de l'oreillette gauche (Fox 1999). Le thrombus peut alors être attaché à la paroi de l'endocarde ou être libre et se déplacer à l'intérieur de la chambre cardiaque. Dans ce dernier cas, le thrombus peut alors obstruer une valvule cardiaque ou s'échapper des chambres cardiaques et emboliser dans d'une artère systémique.

Le site le plus fréquent de TEA est dans l'aorte distale au niveau de la trifurcation iliaque. Cette localisation représente près de 90% des cas cliniques de TEA (Fox 1999). L'artère brachiale droite, les artères mésentériques et certaines artères viscérales peuvent également être affectés (Fox 1999). La symptomatologie classique des TEA se distingue par des signes de douleur, de paralysie, d'absence de pouls fémoral et une froideur à l'extrémité distale des membres pelviens (Fox 1999). La sévérité des signes va dépendre de l'importance et de la durée de l'occlusion vasculaire, de la présence d'une vascularisation collatérale fonctionnelle et de complications (nécrose, automutilation).

5.2. Pathogénie des TEA félins

La pathophysiologie des TEA implique une combinaison de lésions au niveau de l'endothélium cardiaque associées à une stase sanguine au niveau des chambres cardiaques dilatées, une altération du flux sanguin laminaire et une activation possible de la coagulation dans certains cas (Fox 1999).

Chez les chats avec une CMH, la dysfonction diastolique résultant de l'hypertrophie du ventricule gauche cause une dilatation parfois sévère de l'oreillette gauche, de l'œdème pulmonaire et éventuellement une insuffisance cardiaque congestive (Lors et al 1994; Fox 1999). La circulation sanguine est également altérée au niveau des chambres cardiaques en raison de la faible contractilité du myocarde, la dilatation de l'oreillette gauche et la présence de régurgitation mitrale (Lors et al 1974, Fox 1999). Une dilatation sévère de l'oreillette gauche supérieure à 1.9 cm est considérée comme un facteur de risque important

pour les TEA chez les chats (Fox 2000 b). Ces changements hémodynamiques résultent en l'apparition de stase sanguine et de foyers de turbulence au niveau de la chambre atriale gauche. La présence de lésions focales ou diffuses de fibrose dans l'endocarde sont présentes secondairement au jet de régurgitation mitrale et contribuent à l'activation de la coagulation (Tilley et al 1977, Fox 1999).

Peu d'études ont évalué la fonction hémostatique chez les chats souffrant d'une CMH ou d'un TEA. Une étude a rapporté une agrégation plaquettaire activée en présence de sérotonine et de collagène mais diminuée en présence d'ADP, des résultats apparemment contradictoires suggérant respectivement une activation et une inhibition plaquettaire (Welles et al 1994). Cette même étude a également rapporté une élévation de l'activité de l'ATIII chez les chats avec une maladie cardiaque. Des cas d'hyperhomocystéinémie ont été rapportés chez des chats avec une maladie primaire du myocarde ayant développés un TEA (Fox 1999).

6. Marqueurs de la coagulation et maladie cardiaque

En médecine humaine, de nombreux marqueurs de l'activation de la coagulation et de la fibrinolyse ont été évalués chez des patients atteints de maladie cardiaque (Ikeda et al 1997, Fareed et al 1998). Chez les patients atteints d'une insuffisance mitrale, une diminution de l'activité de l'ATIII était associée au développement d'un thrombus dans l'oreillette gauche et une augmentation du taux plasmatique de D-dimères était associée à la

présence d'un thrombus mobile (Yasaka et Beppu 1993). Dans une seconde étude, toujours chez des patients souffrant d'une sténose mitrale, les taux plasmatiques de FPA et de TAT étaient significativement plus élevés dans les échantillons prélevés dans l'oreillette gauche que dans l'oreillette droite ou la circulation périphérique (Ikeda et al 1997). Chez des patients atteints d'une cardiomyopathie hypertrophique ou dilatée, les concentrations plasmatiques de FPA et de TAT étaient significativement plus élevées que chez des sujets normaux (Yamamoto et al 1995, Ikeda et al 1997). Dans la même étude, les taux de TAT et de FPA étaient corrélés positivement avec le diamètre de l'oreillette gauche chez les patients avec une CMH et avec le volume du ventricule gauche en fin de diastole chez les patients avec une CMD. Ces résultats ont suggéré que la coagulation était activée chez les patients atteints d'une cardiomyopathie et que l'oreillette gauche était le site d'activation chez les patients avec CMH. Cependant, le risque de thrombo-embolisme chez ces patients avec des taux élevés de TAT ou de FPA n'a pas été évalué de manière prospective (Lip 1995).

L'évaluation de marqueurs plasmatiques de l'activation de la coagulation n'a pas encore été rapportée chez les chats atteints de maladie cardiaque et plus particulièrement lors de CMH et de TEA.

Chapitre deuxième : Article

Activated coagulation markers in the plasma of healthy cats and cats with primary myocardial disease.

Short title: coagulation markers in cats

Christian Bédard DMV ⁽¹⁾, Anne Lanevski- Pietersma DMV MSc ⁽¹⁾ Marilyn Dunn DMV, MSc⁽²⁾

Département de pathologie et de microbiologie ⁽¹⁾, Département des sciences cliniques ⁽²⁾,
Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, C.P. 5000,
Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6.

Correspondence to Christian Bédard; e-mail address: christian.bedard@umontreal.ca.

Abstract

The purpose of this study was to test the hypothesis that coagulation is activated in cats with primary cardiomyopathy (CM) and cats with arterial thromboembolism (ATE). Levels of thrombin-antithrombin complex (TAT) and D-dimer, antithrombin III activity (ATIII), prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (PTT) were evaluated in the plasma of healthy cats and compared to results obtained in cats with CM and cats with ATE. In cats with CM, the associations between left atrial diameter (LA) and left atrial to proximal aortic diameter ratio (LA:Ao) with TAT, D-dimer, ATIII, PT and PTT were evaluated. Blood samples from 18 healthy cats, 23 cats with CM disease and 4 cats with ATE were obtained. Overall intra-assay coefficients of variation for TAT and D-dimer assays were 1.1% and 4.1% respectively. The reference ranges for D-dimer and TAT in plasma of healthy cats were established between 0.09-0.32 $\mu\text{g/mL}$ and 2.0-20.0 $\mu\text{/L}$ respectively. Median values of TAT, D-dimer, ATIII and PT were not significantly different between groups. Plasma TAT, D-dimer, ATIII, PT and PTT were not significantly correlated with LA or with LA:Ao. The results of this study do not support the hypothesis of activated coagulation in cats with CM and in cats with ATE. However, some cats with CM or ATE had elevated levels of TAT and D-dimer suggesting that a state a hypercoagulability may exists in some cases.

Key words : Hypercoagulability; Thrombin-antithrombin complex; D-dimer, Feline; Cardiomyopathy

Introduction

Cardiac thrombosis and arterial thromboembolism (ATE) are frequent complications of feline myocardial disease^{1,2,3}. The pathogenesis of intracardiac thrombus formation involves a combination of several factors including endothelial injuries, abnormal blood flow, and altered blood coagulability and platelet function⁴. In cats with hypertrophic cardiomyopathy (HCM), the ventricle is hypertrophied resulting in impaired diastolic blood filling and secondary left atrial enlargement, pulmonary edema and eventually congestive heart failure^{5,6}. Focal or diffuse areas of endocardial fibrosis are frequent and may expose subendothelial collagen and tissue factor that can directly initiate platelet adhesion and blood coagulation^{1,7}. Abnormal blood flow occurs secondary to reduced ventricular contractility, left atrial enlargement and mitral regurgitation^{1,6}. This turbulent blood flow activates endothelial cells and promotes platelet adhesion whereas blood stasis prevents inactivation of clotting factors and promotes thrombus growth⁴.

Thrombosis occurs frequently in the left atrium most likely due to poor atrial contractility and blood stasis secondary to chamber dilatation. The left ventricle is occasionally affected while the right cardiac chambers are rarely involved. Resulting thromboembolism affects almost exclusively the systemic aortic circulation and is more commonly located at the distal aortic trifurcation⁶. This results in significant morbidity and represents the major cause of death or euthanasia of cats with HCM^{2,23}. In a recent retrospective study on feline HCM, 33% of cats with adequate follow-up experienced an

episode of ATE³. Cats with a larger atrial diameter were at higher risk for thromboembolism and had shorter survival times^{2,3}.

The high prevalence of ATE in cats with myocardial disease, especially when associated with severe left atrial dilatation, suggests the presence of a prethrombotic state before the onset of thrombus formation. A prethrombotic state can be defined as an imbalance of hemostasis with a tendency to hypercoagulability without clinical signs of thrombosis or fibrin deposition⁸. Spontaneous echo contrast, occasionally observed in the left atrium or in the left ventricle in cats with HCM, results from blood stasis. This phenomenon has been associated with a hypercoagulable state in both human and feline patients^{6,9}. It can be hypothesised that this hypercoagulable state in cats with myocardial disease is linked to the pathogenesis of intracardiac thrombus formation. However, little is actually known about the coagulation system in cats with myocardial disease before the onset of thrombotic events.

Recent advances in the understanding of the molecular aspects of blood coagulation and fibrinolysis have allowed the development of sensitive and specific markers of coagulation activation and fibrin dissolution⁹. In human medicine, these markers have been useful in the diagnosis of various thrombotic diseases such as disseminated intravascular coagulation (DIC)¹¹, deep vein thrombosis¹², pulmonary embolism¹³ and ischemic heart disease¹⁴. These markers have also been used to characterize prethrombotic states in patients with cardiac disease at risk for thrombosis. In human patients with mitral stenosis, decreased levels of antithrombin III (ATIII) were associated with thrombus

development in the left atrium and increased levels of D-dimer was associated with the presence of mobile atrial thrombi¹⁵. In one study, plasma levels of thrombin-antithrombin complex (TAT) and fibrinopeptide A (FPA) were significantly increased in patients with idiopathic cardiomyopathy compared to normal subjects¹⁶. Left atrial diameter was also positively correlated with levels of TAT and FPA in patients with HCM¹⁶. This study concluded that blood coagulation was activated secondary to left atrial dilatation in patients with HCM but the risk of thromboembolism in patients with high levels of coagulation markers was not evaluated prospectively^{16,17}.

Thrombin-antithrombin complex and D-dimer are two interesting molecular markers to evaluate in cats with myocardial disease. Thrombin-antithrombin complexes are highly sensitive molecular markers of thrombin generation. Thrombin half-life is extremely short and direct measurement of its activity is therefore not possible. During coagulation, free thrombin is rapidly bound to ATIII resulting in formation of inactive TAT. Consequently, ATIII activity level decreases and TAT are detected in plasma during active thrombin generation or acute thrombotic events^{14,10}. Thrombin-antithrombin complex lifespan in plasma is approximately 15 minutes¹⁸ and it is removed from the circulation by the mononuclear phagocytic system¹⁹. The human TAT immunoassay shows good cross-reactivity among various animal species²⁰ and has been used to measure TAT levels in healthy horses and in horses with colic^{21,22}. D-dimer is the final product of cross-linked fibrin digestion by plasmin and is a marker of active fibrin generation and fibrinolysis in human medicine. It is widely used as a diagnostic tool for deep vein thrombosis, pulmonary embolism and disseminated intravascular coagulation in clinical

situations²³. An immunoturbidimetric D-dimer assay has previously been evaluated in healthy dogs^{24,25} and demonstrated to be useful for the diagnosis of DIC in dogs²⁵.

The purpose of this study was to evaluate coagulation and fibrinolysis in cats with primary myocardial disease and in cats with ATE. D-dimer and TAT concentrations were measured in healthy adult cats in order to report reference ranges for these molecular markers in this species. Plasma activity of ATIII and plasma levels of D-dimer and TAT were measured in order to test the hypothesis that the coagulation is activated in cats with cardiomyopathy and ATE. Finally, relationships between echocardiographic parameters and molecular markers of coagulation were examined in order to test a second hypothesis that increased left atrial diameter is associated with a state of hypercoagulability in cats with myocardial disease.

Material and methods

Case selection

Blood samples were collected from healthy adult cats owned by staff members or obtained from a cat colony at the Faculté de Médecine Vétérinaire (Université de Montréal). These cats were selected based on a normal physical examination and echocardiographic evaluation, biochemistry parameters within reference limits, normal complete blood count and coagulation profile (prothrombin time and activated partial thromboplastin time), and negative results for plasma fibrinogen degradation product (FDP) by latex agglutination (<5µg/mL).

Blood samples were also collected from cats diagnosed with primary myocardial disease and from cats with clinical evidence of distal aortic thromboembolism. These cats were selected from animals examined at the CHUV (Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire) and were included in the study after client approval. The presence of cardiomyopathy was confirmed by echocardiography performed by experienced small animal internists. Hyperthyroid cats with secondary myocardial hypertrophy were excluded. Total serum T4 was measured in cats older than 6 years of age in order to exclude possible cases of occult hyperthyroidism. Cats with ATE presented typical clinical signs of thromboembolism at the iliac trifurcation: lack of femoral pulses, cyanotic and cold extremities, and intense pelvic limb pain. Cats with ATE had evidence of cardiac disease during cardiac auscultation (heart murmurs or abnormal cardiac rhythm) and/or during echocardiography. None of the cats had received or were currently being treated with drugs prior to their enrolment in this study.

All animals were cared for under the regulations of the animal welfare committee, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal.

Echocardiographic evaluation

Echocardiographic examinations were conducted in accordance with recommended standards for cats⁶. M-mode, Doppler and two-dimensional echocardiographs were performed in left lateral recumbency. Cats were determined to have hypertrophic cardiomyopathy based on measurements taken from standard echocardiographic views as described by Moïse and Fox²⁶. M-mode echocardiography was used to measure left atrial

diameter (LA) and proximal aortic (Ao) diameter. These measurements were used to determine the left atrial to proximal aortic diameter ratio (LA:Ao). Presence of mitral regurgitation and spontaneous echo contrast were also recorded if present.

Blood sampling

Blood samples were obtained by jugular venipuncture using a 23-gauge butterfly needle attached to a connecting tube with a multiple sample luer adapter. Precautions were taken to avoid excessive tissue trauma and coagulation activation during blood collection. Blood was directly transferred into appropriate evacuated collection tubes in the following order: 2 ml in plain tubes without additive, 2 ml in EDTA tubes and 6 ml in two 3.2% buffered sodium citrate mixed in a ratio of 9 parts of blood to 1 part anticoagulant.

A routine clinical chemistry panel and CBC were done on serum and EDTA blood respectively. Platelet count was done on citrated whole blood. Citrated plasma was separated within 45 minutes of collection by centrifugation at 2000 g for 10 minutes and frozen at -70°C in 500 μL aliquots until analyses of ATIII, D-dimer and TAT.

Coagulation time determination and FDP level

Prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (PTT) were determined on citrated plasma in duplicate with a semi-automated mechanical fibrinometer ^a. Semi-quantitation of fibrinogen/fibrin degradation product (FDP) concentrations was determined in citrated plasma using agglutination of latex particles coated with mouse monoclonal antibodies against human FDP ^b. Fibrinogen/fibrin degradation product concentrations below 5 $\mu\text{g/mL}$ were considered negative.

D-dimer, TAT and ATIII assays

D-dimer, TAT and ATIII assays were all performed on citrated plasma, in duplicate and according to the manufacturer's recommendations. D-dimer determinations were done with an automated coagulation analyser using an immunoturbidimetric method ^c. Briefly, this method uses a change in light absorption to detect antigen-antibody reactions resulting in particle agglutination when plasma containing D-dimer is added to a suspension of latex beads coated with mouse monoclonal antibodies against human D-dimer. D-dimer plasma concentrations are reported in $\mu\text{g/mL}$ of fibrinogen equivalent.

Thrombin-antithrombin complex concentrations were determined with an antibody sandwich ELISA ^d, using sequential additions of rabbit polyclonal antibodies against human thrombin followed by peroxidase labelled rabbit polyclonal antibodies against human ATIII. Thrombin-antithrombin complex concentrations are reported in $\mu\text{g/L}$. Antithrombin III activity was determined with a synthetic chromogenic assay performed on an automated coagulation analyser ^e. Results are reported in percentage of activity relative to a commercial calibrator assigned with an ATIII activity of 100%.

Data analyses

A one-stage nested design for variation partition was used to estimate intra-assay variability of D-dimer and TAT assays in healthy cats, cats with cardiomyopathy and cats with ATE. Mean D-dimer and TAT concentrations, ATIII activity and coagulation times were calculated for each animal and used for statistical analysis. The minimal and maximal concentrations of D-dimer and TAT in plasma of healthy cats were used to establish a

reference interval because of small sample size. Kolmogorov-Smirnov tests for normality were used to examine D-dimer and TAT concentration distributions. Kruskal-Wallis one way analysis of variance were used to compare coagulation parameters between healthy cats, cats with cardiomyopathy and cats with ATE. Mann-Whitney U tests were used to compare LA and LA:Ao between healthy cats and cats with cardiomyopathy.

Relationships between echocardiographic findings (LA and LA:Ao) and plasma concentrations of D-dimer and TAT, ATIII activity and coagulation times were tested with a Spearman rank correlation test (r_s). All statistical analyses were two-tailed and the maximum accepted probability for type-1 errors was set at the α level of 0.05. Statistical analyses were performed with Systat 10.2^f.

Results

Blood samples were obtained from 18 healthy cats, 23 cats with cardiomyopathy and 4 cats with ATE. Healthy cats were all spayed and neutered domestic cats, and were composed of 11 males and 7 females varying in age between 1.0 and 5.0 years (median age: 2.25 y). Cats with cardiomyopathy were composed of 19 neutered males, 1 intact male and 3 spayed females varying in age between 1.5 and 16.5 years (median age: 6.2 y). There was 1 Siamese, 1 Main Coon and 21 domestic cats. Echocardiographic diagnosis included 1 restrictive cardiomyopathy and 22 hypertrophic cardiomyopathies. One cat was presented with moderate pulmonary edema and another with pleural effusion. However, the majority of these animals were asymptomatic. None were under medical treatment at the time of

evaluation. Cats with ATE were all domestic cats and composed of 3 neutered males and 1 spayed female varying in age between 1.5 and 3.0 years.

D-dimer and TAT complexes assays

Overall intra-assay coefficients of variation among all groups of cats were 1.1% for D-dimer and 4.1% for TAT concentrations (Table 1). In healthy cats, D-dimer concentrations ranged between 0.09 and 0.52 $\mu\text{g/mL}$. The reference range was established between 0.09 and 0.32 $\mu\text{g/mL}$ after removal of an apparent outlier with a concentration value of 0.52 $\mu\text{g/mL}$. D-dimer concentrations were normally distributed ($p>0.15$) within that range (Fig 1). TAT complex concentrations ranged between less than 2.0 to 20 $\mu\text{g/L}$ and were not normally distributed ($p<0.01$), with a distribution strongly skewed to the right (Fig 2).

D-dimer concentration, TAT complex concentration, ATIII activity, PT and PTT were not significantly different between healthy cats, cats with cardiomyopathy and cats with ATE (Table 2). Despite no significant differences between groups, the highest D-dimer and TAT complex concentrations were measured in cats with cardiomyopathy (Fig 3 and 4). Slightly lower ATIII activities and longer PT were also measured in cats with cardiomyopathy and cats with ATE compared to healthy cats (Fig 5 and 6).

Echocardiographic findings

Left atrial diameter was significantly larger in cats with cardiomyopathy than in healthy cats ($p=0.0012$) as well as the ratio between left atrial diameter and proximal aortic diameter ($p=0.002$) despite a marked range overlap (Fig 7 and 8). In cats with myocardial

disease, D-dimer concentration, TAT complex concentration, ATIII activity, PT and PTT were not correlated with LA or with LA: Ao (Table 3).

Discussion

The results of this study do not support the hypothesis that the coagulation system is activated in cats with cardiomyopathy. However, high concentrations of D-dimer and TAT were present in the plasma of some cats with CM and ATE. This suggests that some cats with myocardial disease had evidence of activated coagulation and the absence of significant differences between the study groups may have been related to the limitations of this study. First, statistical analysis may have been subjected to beta errors because of small sample size, especially for the ATE group. Also, most cats included in the cardiomyopathy group were initially asymptomatic and were most likely presented early in the course of their disease. Therefore, cardiac abnormalities may have been too mild to trigger coagulation activation in most cases.

Cats with hypertrophic cardiomyopathy are characterized by the presence of a hypertrophied ventricle and diastolic dysfunction, changes progressively leading to LA enlargement and eventually congestive heart failure. In human medicine, congestive heart failure has been well recognised to confer a hypercoagulable state predisposing to thrombosis and thromboembolic events²⁷. In feline ATE, the majority of cats have concurrent evidence of congestive heart failure such as pulmonary edema or pleural effusion^{2,6}. The vast majority of cats in this study displayed no signs of congestive heart failure or severe left atrial dilation. Left atrial diameter and LA:Ao in cats with

cardiomyopathy were significantly greater than in healthy cats but median values were still within the normal range reported for normal cats²⁸. In a large retrospective study on cats with HCM, LA diameter was 1.50 ± 0.27 cm in subclinical cases of HCM, 1.80 ± 0.43 cm in cats with congestive heart failure and 1.99 ± 0.49 cm in cats with ATE. These results indicate that cats with myocardial disease included in this study had only mild LA enlargement, especially when compared to cats with ATE or congestive heart failure. However, cats with high concentrations of D-dimer or TAT were not characterized by large left atria or by signs of congestive heart failure. In these cases, other factors may have initiated the coagulation cascade.

The inability to detect a prethrombotic state in cats with myocardial disease could be related to the pathogenesis of cardiac thrombosis in cats. It is possible that platelet function is activated more significantly than the coagulation cascade by endothelial lesions or by altered blood flow during the prethrombotic phase or during the early steps of thrombus formation. One study on platelet function has suggested that platelets have increased responsiveness to collagen in cats with cardiac disease compared to healthy cats²⁹. However, one study in human medicine evaluated plasma markers of platelet activation, platelet factor 4 and β -thromboglobulin, in patients with cardiomyopathy and concluded that platelet activity was not increased compared to healthy subjects^{16,30}. More information on platelet activity in cats with cardiomyopathy is required to evaluate their role in cardiac thrombogenesis.

Lack of cross-reactivity between immunological reagents and feline antigens unlikely explains the non-significant differences in D-dimer and TAT concentrations between groups. Although the TAT and the D-dimer assays used in this study have never been validated for cats, the presence of significant concentrations of these markers in some cases suggests a certain level of cross-reactivity. The Enzygnost TAT assay is based on polyclonal antibodies against human thrombin and antithrombin and it has been demonstrated to have good cross-reactivity among various mammals²⁰. This assay has been used in veterinary medicine but its sensitivity and specificity to feline TAT has never been assessed with certainty. Various assays for D-dimer detection are commercially available, and some have been tested and validated for clinical use in veterinary medicine^{24,25}. However, complete validation for the feline species is still lacking.

Few studies have evaluated the coagulation system in cats diagnosed with cardiac disease and especially with primary myocardial disease. One study has reported several haemostatic dysfunctions in cats with cardiac disease, including altered platelet function and increased ATIII activity attributed to an acute-phase response²⁹. In our study, an acute phase response may have been present in one cat with myocardial disease and in one cat with ATE with high ATIII activity. However, in most cases ATIII activity appeared to decrease in cats with cardiomyopathy and ATE. Although not a statistically significant result, this suggests that ATIII consumption secondary to thrombin activation may occur in mild cases of myocardial disease and in some cases of ATE. This is consistent with decreased levels of ATIII plasma activity that have been associated with development of a

fresh thrombus or enlargement of an existing one in human patients with cardioembolic stroke ¹⁵.

Other molecular markers of coagulation activation have been evaluated in human patients with cardiac disease. During normal coagulation, prothrombin fragments 1+2 (F₁₊₂) are released during the activation of prothrombin into thrombin by factor Xa ^{9,14}. Once activated, thrombin converts fibrinogen into fibrin, releasing fibrinopeptide A (FPA) ^{9,14}. Increased levels of F₁₊₂ and FPA were found in patients with atrial fibrillation and these findings were associated with an increased risk of thromboembolism ⁹. Fibrinopeptide A was also increased in patients with cardiomyopathy and plasma levels were correlated with left atrial diameter ¹⁶. These markers could be used in the future to demonstrate a prethrombotic state in animals but available commercial immunoassays have showed poor and moderate cross-reactivity with animal F₁₊₂ and FPA respectively ²⁰. These results have been attributed to a presumed heterogeneity in amino acid sequences among mammals.

The reference interval of D-dimer concentration determined by an immunoturbidimetric method in 18 healthy cats was established as 0.09-0.32 µg/mL. This reference interval is similar to those reported for healthy dogs and humans. Overall intra-assay variation in feline plasma was also similar to the one reported for human plasma by the manufacturer (between 3 and 14%) ⁹. The reference interval for TAT concentration in healthy cats was established as 0.0-20.0µg/L. In healthy human subjects, the manufacturer

sets the reference interval as 1.0-4.1 μ g/L. Overall intra-assay variation was also similar to the one reported for TAT in human plasma (between 4 and 6%)^d.

D-dimer and TAT can be measured in feline plasma using commercial assays and could be used to characterize a prethrombotic state in cats. However, it was not possible to utilise these molecular markers to demonstrate a prethrombotic state in cats with cardiomyopathy. This prethrombotic state most likely exists but may only be present in more severely affected cats with clinical signs of congestive heart failure or with larger left atria. It is also possible that other molecular markers of coagulation activation such as FPA and F₁₊₂ or plasma markers of platelet activity may be more sensitive in demonstrating a hypercoagulable state in cats with primary myocardial disease. In humans with acquired conditions associated with increased risk of thrombosis, detection of hypercoagulability often requires measurement of several markers of activated coagulation³¹.

In a clinical setting, molecular markers would be useful in identifying patients with activated coagulation. However, prospective studies will be necessary to prove the usefulness of these markers in predicting the risk of thromboembolism and in evaluating the benefit of early antithrombotic therapy.

Footnotes

^a Amelung KC4™ Coagulation Analyzer, Heinrich Amelung GmbH, Lemgo, Germany
(distributed by Sigma Diagnostics St.Louis, Missouri)

^b FDP plasma kit®, Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, France

^c STA-Liatest® D-DI, Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, France

^d Enzygnost® TAT micro, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Germany

^e STA-STACHROM® ATIII, Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, France

^f Systat software inc, Richmond, Ca

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr Rocky Difrusia DVM, DACVIM and Dre Mylène Taillefer DVM (Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal) for their assistance to this study, Anik Cormier (Laboratoire de coagulation, Hôpital Sainte-Justine) for the TAT, ATIII and D-dimer analyses and Guy Beauchamp, PhD, for valuable statistical recommendations. This study was conducted at the Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal and was supported by the Fonds du Centenaire (Faculté de Médecine Vétérinaire) and a grant from the Académie de Médecine Vétérinaire du Québec.

References

1. Tilley LP, Liu S-K, Gilbertson SR et al. Primary myocardial disease in the cat, a model for human cardiomyopathy. *Am J Pathol* 1977; 86 : 493-513.
2. Laste NJ, Harpster NK. A retrospective study of 100 cases of feline distal aortic thromboembolism : 1977-1993. *J Am Anim Hosp Assoc* 1995; 31: 492-500.
3. Rush JE, Freeman LM, Fenollosa NK, Brown DJ. Population characteristics of cats with hypertrophic cardiomyopathy: 260 cases (1990-1999). *J Am Vet Med Assoc* 2002; 220: 202-207.
4. Jobin F. *La thrombose*. Québec: Les Presses de l'Université Laval, and Paris: Les Éditions Maloine; 1995 : 321 pages.
5. Lord PF, Wood A, Tilley LP, Liu S-K. Radiographic and hemodynamic evaluation of cardiomyopathy and thromboembolism in the cat. *J Am Vet Med Assoc* 1974; 164:154-165.
6. Fox PR. Feline cardiomyopathies. In: Fox PR, Sisson D, Moïse NS, eds. *Textbook of canine and feline cardiology: principles and clinical practice*, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1999: 621-678.
7. Fox , PR. 2000. Feline cardiomyopathies. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of veterinary internal medicine*, 5th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2000: 896-923.

8. Mannucci PM, Giangrande PLF. Detection of the prethrombotic state due to procoagulant imbalance. *Eur J Haematol* 1992; 48: 65-69.
9. Tsai L-M, Chen J-H, Tsao C-J. Relation of left atrial spontaneous echo contrast with prethrombotic state in atrial fibrillation associated with systemic hypertension, idiopathic dilated cardiomyopathy, or no identifiable cause (lone). *Am J Cardiol* 1998; 81: 1249-1252.
10. Tripodi A, Mannucci PM. Markers of activated coagulation and their usefulness in the clinical laboratory. *Clin Chem* 1996; 42: 664-669.
11. Bick RL. Disseminated intravascular coagulation: objective criteria for clinical and laboratory diagnosis and assessment of therapeutic response. *Clin Appl Thromb Hemost* 1995; 1:3-23.
12. Bounameaux, H, de Moerloose P, Perrier A, Reber G. Plasma measurement of D-dimer as diagnostic aid in suspected venous thromboembolism : an overview. *Thromb Haemost* 1994; 71: 1-6.
13. Bounameaux H, Cirafici P, de Moerloose P, et al. Measurement of D-dimer in plasma as diagnostic aid in suspected pulmonary embolism. *Lancet* 1991; 337:196-200.
14. Fareed J, Hoppensteadt DA, Leya F, et al. Useful laboratory tests for studying thrombogenesis in acute cardiac syndromes. *Clin Chem* 1998; 44 :1845-1853.
15. Yasaka M, Beppu S. Hypercoagulability in the left atrium: part II: coagulation factors. *J Heart Valve Dis* 1993; 2: 25-34.

16. Yamamoto K, Ikeda U, Furuhashi K, et al. The coagulation system is activated in idiopathic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25: 1634-1640.
17. Lip GYH. Letters to the editor: the coagulation is activated in idiopathic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 1757.
18. Roncalès FJ, Sancho, JM. Coagulation activators. In: Feldman BF, Zinkl JG et Jain, eds. *NC. Schalm's Veterinary Hematology 5th Ed.* Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins; 2000 : 532-537.
19. Johnstone IB. Coagulation inhibitors. In: Feldman BF, Zinkl JG et Jain NC, eds. *Schalm's Veterinary Hematology 5th Ed.* Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins; 2000 : 538-543.
20. Ravanat C, Freund M, Dol F, et al. Cross-reactivity of human molecular markers for detection of prethrombotic states in various animals species. *Blood Coagul Fibrin* 1995; 6: 446-455.
21. Topper MJ, Prasse KW, Morris MJ, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for thrombin-antithrombin III complexes in horses. *Am J Vet Res* 1996; 57: 427-431.
22. Topper MJ, Prasse KW. Uses of enzyme-linked immunosorbent assay to measure thrombin-antithrombin III complexes in horses with colic. *Am J Vet Res* 1996; 57: 456-462.

23. Lip GYH, Lowe GDO. Fibrin d-dimer : a useful clinical marker of thrombogenesis? *Clin Sci* 1995; 89: 205-214.
24. Calin M, Furlanello T, Lubas G. Validation of an immunoturbidimetric D-dimer assay in canine citrated plasma. *Vet Clin Path* 2000; 29: 51-54.
25. Stokol T, Brooks, MB, Erb HN, Mauldin GE. D-dimer concentrations in healthy dogs and dogs with disseminated intravascular coagulation. *Am J Vet Res* 2000; 61: 393-398.
26. Moise NS and Fox PR. Echocardiography and Doppler imaging. In: Fox PR, Sisson D, Moise NS, eds. *Textbook of canine and feline cardiology: principles and clinical practice*, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1999: 130-171.
27. Lip GYH, Gibbs CR. Does heart failure confer a hypercoagulable state? Virchow's triad revisited. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33: 1424-1426.
28. Jacobs A, Knight DH.. M-mode echocardiographic measurements in nonanesthetized healthy cats : effects of body weight, heart rate, and other variables. *Am J Vet Res* 1985; 46: 1705-1711.
29. Welles EG, Boudreaux MK, Cramer CS, Tyler EG. Platelet function and antithrombin, plasminogen, and fibrinolytic activities in cats with heart disease. *Am J Vet Res* 1994; 55: 619-627.
30. Ikeda U, Yamamoto K, Shimada K. Biochemical markers of coagulation activation in mitral stenosis, atrial fibrillation, and cardiomyopathy. *Clin Cardiol* 1997; 20: 7-10.

31. López Y, Paloma MJ, Rifón J, et al. Measurement of prethrombotic markers in the assessment of acquired hypercoagulable states. *Thromb Res* 1999; 93: 71-78.

List of figures and figures

Figure 1 – D-dimer concentration distribution in plasma of 17 healthy cats with superimposed normal distribution curve.

Figure 2 – TAT complex concentration distribution in plasma of 18 healthy cats.

Figure 3 – D-dimer plasma concentrations in healthy cats, cats with cardiomyopathy (CM) and cats with arterial thromboembolism (ATE) ($p=0.110$).

Figure 4 – TAT complex plasma concentration in healthy cats, cats with cardiomyopathy (CM) and cats with arterial thromboembolism (ATE) ($p=0.135$).

Figure 5 – Antithrombin III activity in healthy cats, cats with cardiomyopathy (CM) and cats with arterial thromboembolism (ATE) ($p=0.107$).

Figure 6 – Prothrombin time in healthy cats, cats with cardiomyopathy (CM) and cats with arterial thromboembolism (ATE) ($p=0.111$).

Figure 7 – Left atrial diameter of healthy cats, cats with cardiomyopathy (CM) and cats with arterial thromboembolism (ATE) (* $p=0.0012$).

Figure 8 – Left atrial: proximal aorta diameter ratio (LA:Ao) in healthy cats, cats with cardiomyopathy (CM) and cats with arterial thromboembolism (ATE) (* $p=0.002$). The horizontal dashed line indicates the upper limit of the reference range for LA:Ao ratio set at 1.5 in healthy cats.

Figure 1.

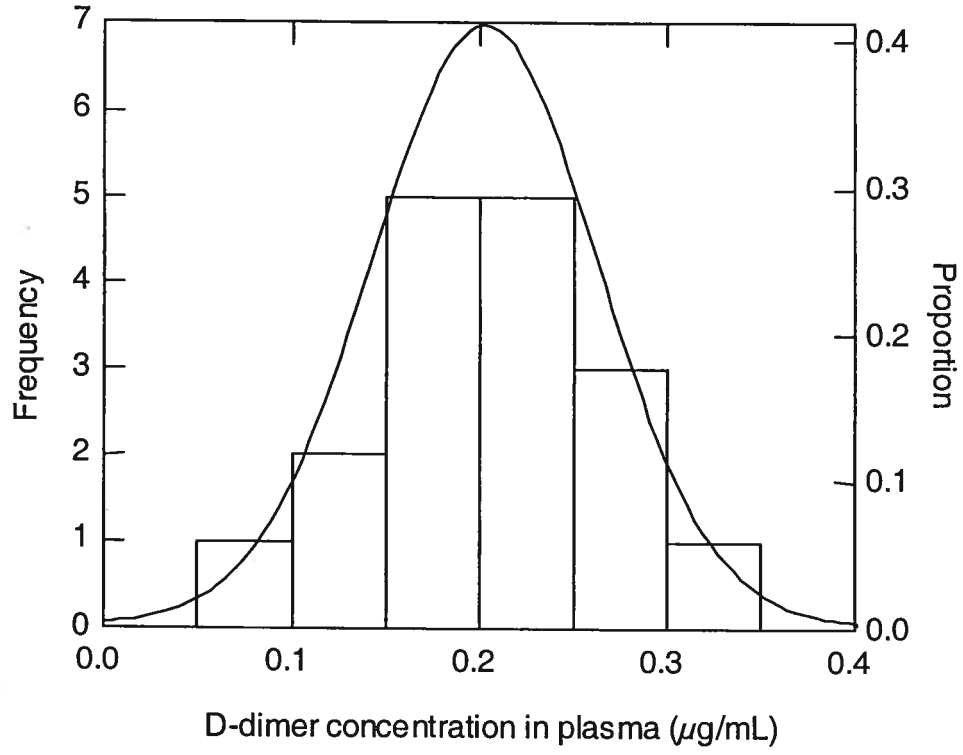


Figure 2.

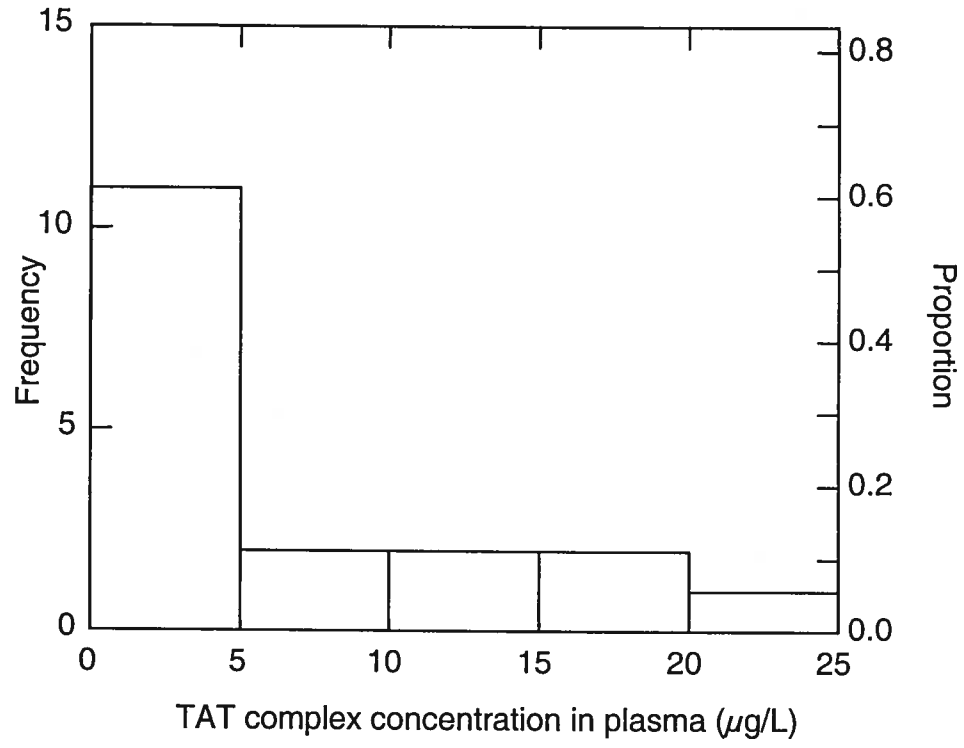


Figure 4.

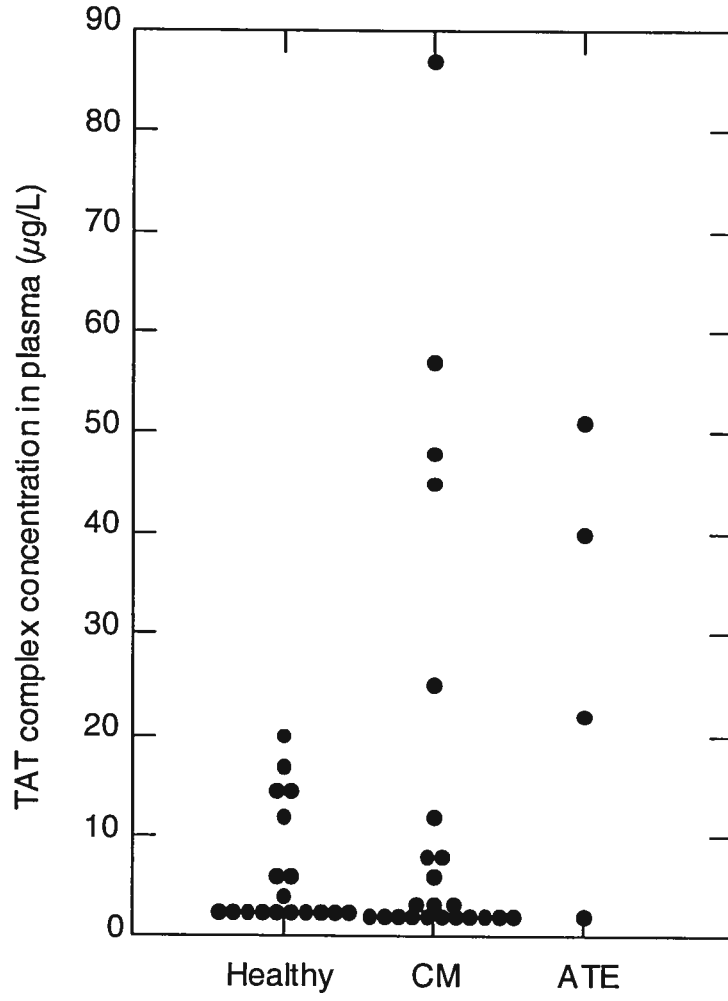


Figure 5.

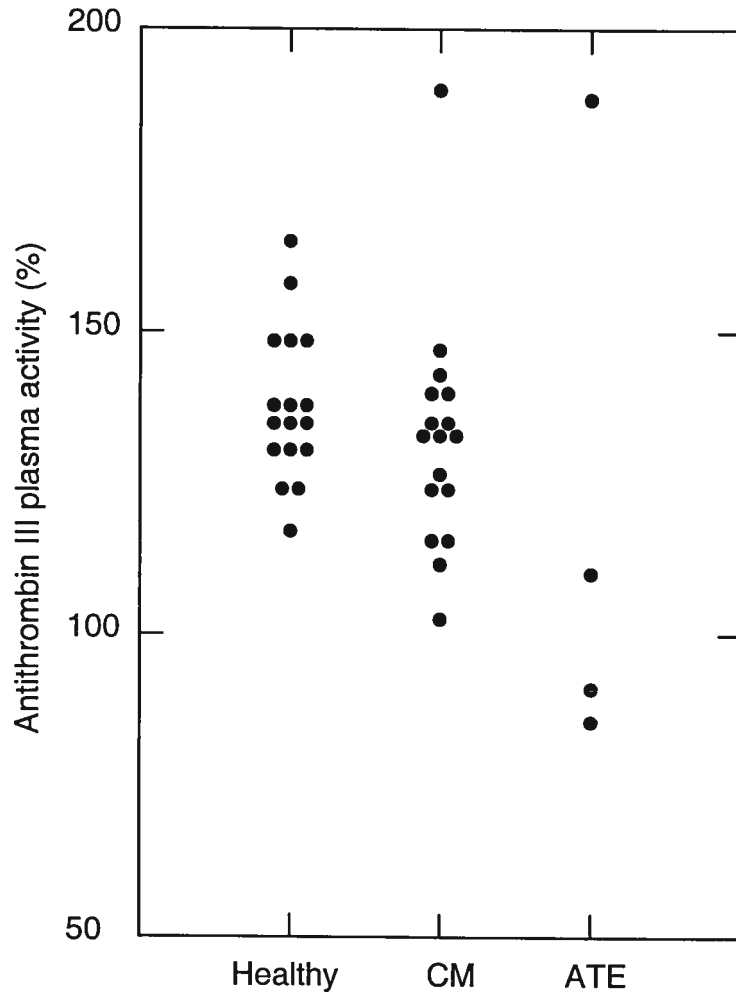
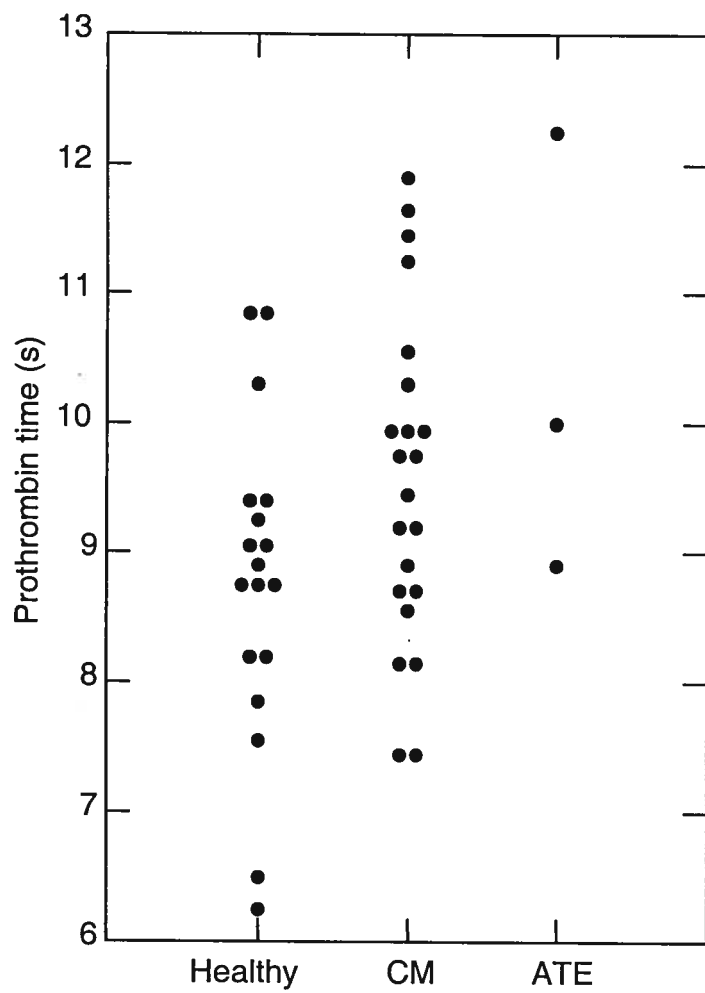


Figure 6.



Tables

Table I - Intra-assay coefficients of variation (CV) for D-dimer and TAT complex assays.

Group	D-dimer CV (%)	TAT complex CV (%)
Healthy	1.2	6.5
CM	1.1	2.9
ATE *	-	-
Overall	1.1	4.1

*Intra-assay CV (coefficient of variation) were not calculated for ATE cats because of small sample size.
TAT: thrombin-antithrombin complex, CM: cardiomyopathy, ATE: arterial thromboembolism

Table II - Coagulation parameters of healthy cats, cats with cardiomyopathy and cats with arterial thromboembolism.

Parameter	Unit	Healthy median (mean±sd) n	Cardiomyopathy median (mean±sd) n	ATE median (mean±sd) n	p value
D-dimer	µg/mL	0.225 (0.220±0.095) n=18	0.140 (0.380±0.834) n=23	0.210 (0.195±0.068) n=4	0.110
TAT complex	µg/L	2.5 (6.4±6.2) n=18	2.0 (14.1±22.9) n=23	31.0 (28.8±21.5) n=4	0.135
ATIII	%	137 (138±12) n=17	134 (132±19) n=17	105 (119±48) n=4	0.107
PT	s	8.9 (8.8±1.2) n=18	9.6 (9.6±1.3) n=22	10.0 (10.4±1.7) n=3	0.111
PTT	s	14.5 (15.6±3.6) n=18	14.9 (16.2±1.3) n=22	19.4 (20.8±10.4) n=3	0.732

ATE: arterial thromboembolism, LA: left atrial diameter, LA:Ao: left atrial to proximal aortic diameter ratio, TAT: thrombin-antithrombin complex, ATIII: antithrombin III, PT: prothrombin time, PTT: activated partial thromboplastin time.

Table III - Spearman's correlation coefficients between echocardiographic findings (LA and LA: Ao) and coagulation parameters measured in cats with cardiomyopathy.

Parameters	LA diameter	LA :Ao
	r_s	r_s
D-dimer	0.039 (n=20)	-0.004 (n=20)
TAT	-0.214 (n=21)	-0.127 (n=21)
ATIII	-0.232 (n=16)	-0.187 (n=16)
PT	-0.032 (n=21)	-0.075 (n=21)
PTT	0.075 (n=21)	0.022 (n=20)

Results of correlations tests were not significant ($p > 0.10$).
 LA: left atrial diameter, LA:Ao: left atrial to proximal aortic diameter ratio, TAT: thrombin-antithrombin complex, ATIII: antithrombin III, PT: prothrombin time, PTT: activated partial thromboplastin time.

Chapitre troisième

Discussion générale des résultats et conclusion

Les éléments discutés dans cette section reprennent ceux énoncés en grandes lignes dans la discussion du manuscrit soumis pour publication : « *Activated coagulation markers in the plasma of healthy cats and cats with primary myocardial disease* ».

Les résultats de cette étude ne supportent pas l'hypothèse que les chats avec CMH ou TEA démontrent une augmentation significative des concentrations plasmatiques de TAT et de D-dimères. Cependant, la présence de concentrations élevées de TAT et de D-dimères dans le plasma de quelques chats avec CM ou ATE ont démontré une activation de la coagulation chez certains patients. L'absence de différence significative entre les groupes de chats est possiblement reliée aux limitations de cette étude. Premièrement, la faible taille d'échantillons a limité la puissance des analyses et la présence d'erreur bêta ne peut donc être totalement exclue. De plus, la plupart des chats avec cardiomyopathie étaient initialement asymptomatiques et étaient probablement présentés au début de leur maladie. Il est alors possible que les modifications cardiaques étaient trop légères pour activer les mécanismes de la coagulation de façon suffisantes pour causer une augmentation des TAT et D-dimères plasmatiques.

La cardiomyopathie hypertrophique féline se caractérise par la présence d'un ventricule gauche hypertrophié et une dysfonction diastolique menant progressivement à une dilatation de l'oreillette gauche et éventuellement à une insuffisance cardiaque. En médecine humaine, l'insuffisance cardiaque est considérée comme un facteur de risque additionnel qui prédispose à la thrombose. Lors de TEA félines, la majorité des chats démontrent des signes compatibles avec une insuffisance cardiaque (œdème pulmonaire ou

effusion pleurale). La très grande majorité des chats de cette étude étaient asymptomatiques et ne démontraient pas de signes d'insuffisance cardiaque ou de dilatation sévère de l'oreillette gauche. La majorité des chats avec CM et TEA avait une OG de dimension normale. Dans une étude rétrospective sur la CMH féline, le diamètre de l'OG était de 1.50 ± 0.27 cm chez les chats asymptomatiques, 1.80 ± 0.43 cm chez les chats en insuffisance cardiaque et 1.99 ± 0.49 cm chez les chats avec TEA (Rush et al 2000). Dans notre étude, les chats avec CM avaient un diamètre moyen de l'OG de 1.51 ± 0.38 cm, une valeur comparable aux chats asymptomatiques de l'étude de Rush et al 2000. Toutefois, dans notre étude, les cas avec TAT et D-dimères élevés ne démontraient pas de signes d'insuffisance cardiaque ou une OG fortement dilatée. D'autres facteurs ont possiblement contribué à l'activation de la coagulation chez ces animaux.

Il est peu probable que l'absence de différence significative entre les taux plasmatiques de TAT et de D-dimères soit attribuable à une faible réaction entre les réactifs immunologiques et les antigènes félines. Même si les trousseuses utilisées dans cette étude n'ont jamais été validées chez le chat, la présence de concentrations plasmatiques non négligeables dans plusieurs cas suggère un certain niveau de réaction croisée. Une bonne réaction croisée a d'ailleurs été rapportée pour plusieurs espèces de mammifères (Ravanat et al 1995). Plusieurs trousseuses sont disponibles pour le dosage des D-dimères et certaines ont été validées pour un usage clinique en médecine vétérinaire (Calin et al 2000, Stokol et al 2000). Cependant, aucune de ces trousseuses n'a été validée pour l'espèce féline.

Peu d'études ont évalué la coagulation chez les chats atteints d'une maladie cardiaque. Une étude a rapporté plusieurs altérations hémostatiques chez les chats avec maladies cardiaques, notamment une élévation de l'ATIII attribuée à une réponse inflammatoire aiguë. Dans notre étude, un chat avec CM et un autre avec TEA ont démontré une activité élevée de l'ATIII possiblement attribuable à une réponse inflammatoire. Cependant, de façon générale, l'activité de l'ATIII semblait diminuée chez les chats avec CM et TEA. Bien que non-significatif, ce résultat suggère une consommation de l'ATIII compatible avec une hypothèse d'activation de la coagulation.

L'intervalle de référence pour la concentration plasmatique de D-dimères déterminée par immunoturbidimétrie chez 18 chats en santé a été établi à 0.09-0.32 $\mu\text{g/mL}$. Cet intervalle est similaire à ce qui a été rapporté chez l'humain et le chien. La variation intra-test était également similaire à celle rapportée par le fabricant de la trousse pour du plasma humain (entre 3 et 14%). L'intervalle de référence pour la concentration plasmatique de TAT chez des chats en santé a été établi à 0.0-20.0 $\mu\text{g/L}$. Le fabricant mentionne un intervalle de référence entre 1.0-4.1 $\mu\text{g/L}$ chez des humains en santé. La variation intra-test était également similaire à celle rapportée pour les TAT chez l'humain (entre 4 et 6%).

Il n'a pas été possible d'utiliser les TAT et D-dimères comme marqueurs de l'activation de la coagulation pour démontrer la présence d'un état préthrombotique chez la majorité des chats avec cardiomyopathie. Un état préthrombotique est vraisemblablement présent mais possiblement seulement chez les chats démontrant des signes cliniques

d'insuffisance cardiaque ou avec des oreillettes gauches plus dilatées. Chez l'homme, la démonstration d'un état préthrombotique chez des patients démontrant des risques de thrombose nécessite parfois l'utilisation de plusieurs marqueurs. Une telle approche est probablement également nécessaire en médecine vétérinaire.

En conclusion, les résultats de cette étude suggèrent que les trousse commerciales humaines STA-Liatest D-Di ® et Enzygnost TAT micro ® peuvent être utilisées chez le chat pour respectivement mesurer les D-dimères et les TAT plasmatiques. Cependant, cette étude n'a pas rigoureusement validé l'utilisation de ces trousse pour l'espèce féline.

La poursuite de cette étude devra viser la réalisation de trois objectifs. Premièrement, cette étude devra valider les trousse de dosage de D-dimères et de TAT. Ces trousse peuvent être validées d'une façon indirecte en utilisant les chats avec TEA comme des contrôles positifs

Deuxièmement, pour atteindre une puissance statistique suffisante, cette étude devra recruter un nombre plus élevé d'animaux, particulièrement dans le groupe de chat avec TEA et de chat avec cardiomyopathie. Pour ce dernier groupe, une sélection visant l'inclusion de chats démontrant des signes d'insuffisance cardiaque ou avec des oreillettes gauches très dilatées permettrait d'accentuer les différences avec le groupe de chats normaux et d'améliorer la puissance statistique.

Enfin, l'incapacité de détecter un état préthrombotique chez les chats avec CM était potentiellement associée à la pathogénie des TEA. La fonction plaquettaire est

possiblement plus activée que la cascade de la coagulation en présence de lésions endothéliales et de modifications du flux sanguin. Une étude a d'ailleurs démontré une activation plaquettaire en présence de collagène chez les chats avec maladie cardiaque (Welles et al 1994). Cependant, une étude en médecine humaine n'a pu mettre en évidence une activation plaquettaire chez des patients avec cardiomyopathie en mesurant les taux de facteur plaquettaire 4 et de β -thromboglobuline, deux marqueurs plasmatiques de l'activation des plaquettes (Yamamoto et al 1995). Des informations additionnelles sur la fonction plaquettaire chez les chats avec CM seront donc nécessaires pour déterminer le rôle des plaquettes dans la thrombogénèse cardiaque.

Bibliographie

Aasen AO, Gallimore MJ, Ohlsson K, Amundsen E. Alterations of plasmin activity, plasminogen levels and activity of antiplasmin during endotoxin shock in dogs.

Haemostasis 1978; 7: 164-169.

Arkel YS, Paidas MJ, Ku DH. The use of coagulation activation markers (soluble fibrin polymer, TpPtm, prothrombin fragment 1.2, thrombin-antithrombin, and D-dimer) in the assessment of hypercoagulability in patients with inherited and acquired prethrombotic disorders. Blood Coagul Fibrinolysis 2002; 13 : 199-205.

Bannerman DB, Goldblum SE. Direct effect of endotoxin on the endothelium: barrier function and injury. Lab Invest 1999; 10 :1181-1199.

Bauer KA, Rosenberg RD. The pathophysiology of prethrombotic state in humans: insights gained from studies using markers of hemostatic system activation. Blood 1987; 70: 343-350.

Bick RL. Disseminated intravascular coagulation: objective criteria for clinical and laboratory diagnosis and assessment of therapeutic response. Clin Appl Thrombosis/Hemostasis 1995; 1:3-23.

Boicclair MD, Ireland H, Lane DA. Assessment of hypercoagulable states by measurement of activation fragments and peptides. Blood Rev 1990; 4 : 25-40.

Bounameaux H, Cirafici P, de Moerloose P, et al. Measurement of D-dimer in plasma as diagnostic aid in suspected pulmonary embolism. *Lancet* 1991; 337:196-200.

Bounameaux, H, de Moerloose P, Perrier A, Miron M-J. D-dimer testing in suspected venous thromboembolism: an update. *Q J Med* 1997; 90: 437-442.

Bounameaux, H, de Moerloose P, Perrier A, Reber G. Plasma measurement of D-dimer as diagnostic aid in suspected venous thromboembolism : an overview. *Thromb Haemostas* 1994; 71: 1-6.

Broze GJ. Tissue factor pathway inhibitor and the current concept of blood coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995; 6: S7-S13.

Calin M, Furlanello T, Lubas G. Validation of an immunoturbidimetric D-dimer assay in canine citrated plasma. *Vet Clin Path* 2000; 29: 51-54.

Carr AP, Johnson GS. A review of hemostatic abnormalities in dogs and cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 1994; 30: 475-482.

Darien BJ. Coagulation activators. Dans: Feldman BF, Zinkl JG et Jain, eds. NC.

Schalm's Veterinary Hematology 5th Ed. Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, 2000 ; 544-548.

De Gopegui RR, Navarro T. Vascular wall: endothelial cell. Dans: Feldman BF, Zinkl JG et Jain, eds. NC. Schalm's Veterinary Hematology 5th Ed. Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, 2000 ; 526-527.

- Dodds WJ. Other hereditary coagulopathies. Dans: Feldman BF, Zinkl JG et Jain, eds. NC. Schalm's Veterinary Hematology 5th Ed. Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, 2000 ; 1030-1036.
- Esmon C. The protein C pathway. Crit Care Med 2000; 28 suppl. : S44-S48.
- Fareed J, Hoppensteadt DA, Leya F, et al. Useful laboratory tests for studying thrombogenesis in acute cardiac syndromes. Clin Chem 1998; 44 :1845-1853.
- Fox , PR. 2000a. Feline cardiomyopathies. Dans: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. Textbook of veterinary internal medicine, 5th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2000; 896-923.
- Fox , PR. 2000b. CVT update : therapy for feline myocardial disease. Dans: Bonagura JD, eds. Kirk's current veterinary therapy XIII, Small animal practice. Philadelphia: WB Saunders, 2000; 762-767.
- Fox PR. Feline cardiomyopathies. Dans: Fox PR, Sisson D, Moïse NS, eds. Textbook of canine and feline cardiology: principles and clinical practice, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1999; 621-678.
- Furie B, Furie BC. Molecular and cellular biology of blood coagulation. N Eng J Med 1992; 326: 800-806.

Hoppensteadt DA, Jeske W, Fareed J et al. The role of tissue factor pathway inhibitor in the mediation of the antithrombotic actions of heparin and low-molecular-weight-heparin.

Blood Coagul and Fibrinolysis 1995; 6 : S57-S64.

Ikeda U, Yamamoto K, Shimada K. Biochemical markers of coagulation activation in mitral stenosis, atrial fibrillation, and cardiomyopathy. Clin Cardiol 1997; 20: 7-10.

Jacobs A, Knight DH. M-mode echocardiographic measurements in nonanesthetized healthy cats : effects of body weight, heart rate, and other variables. Am J Vet Res 1985; 46: 1705-1711.

Jobin F. La thrombose. Québec: Les Presses de l'Université Laval et Paris: Les Éditions Maloine, 1995; 321 pp.

Johnstone IB. Coagulation inhibitors. Dans: Feldman BF, Zinkl JG et Jain NC, eds. Schalm's Veterinary Hematology 5th Ed. Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, 2000 ; 538-543.

Lanevski A, Kramer JW, Greene SA, Meyers KM. Evaluation of chromogenic substrate assays for fibrinolytic analytes in dogs. Am J Vet Res 1996; 57: 1124-1130.

Laste NJ, Harpster NK. A retrospective study of 100 cases of feline distal aortic thromboembolism : 1977-1993. J Am Anim Hosp Assoc 1995; 31: 492-500.

Lip GYH, Gibbs CR. Does heart failure confer a hypercoagulable state? Virchow's triad revisited. J Am Coll Cardiol 1999; 33: 1424-1426.

Lip GYH, Lowe GDO. Fibrin D-dimer : a useful clinical marker of thrombogenesis? Clin Sci 1995; 89: 205-214.

Lip GYH. Letters to the editor: the coagulation is activated in idiopathic cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 1995; 26: 1757.

López Y, Paloma MJ, Rifón J, et al. Measurement of prethrombotic markers in the assessment of acquired hypercoagulable states. Thromb Res 1999; 93:71-78.

Lord PF, Wood A, Tilley LP, Liu S-K. Radiographic and hemodynamic evaluation of cardiomyopathy and thromboembolism in the cat. J Am Vet Med Assoc 1974; 164:154-165.

Mannucci PM, Giangrande PLF. Detection of the prethrombotic state due to procoagulant imbalance. Eur J Haematol 1992; 48: 65-69.

Mitchell RN, Cotran RS. Hemodynamic disorders, thrombosis, and shock. Dans: Cotran RS, Kumar V et Collins T, eds. Robbins' pathologic basis of disease, 6th edition. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999; 113-138.

Nemerson Y. Tissue factor and hemostasis. Blood 1988; 71:1-8.

Prasse KW, Tropper MJ, Moore JN, Welles EG. Analysis of hemostasis in horses with colic. J Am Vet Med Assoc 1993; 5: 685-693.

Ravanat C, Freund M, Dol F, et al. Cross-reactivity of human molecular markers for detection of prethrombotic states in various animals species. *Blood Coagul Fibrin* 1995; 6: 446-455.

Rocha E, Páramo JA, Fernández FJ et al. Clotting activation and impairment of fibrinolysis in malignancy. *Thrombo Res* 1989; 54: 699-707.

Roncalès FJ, Sancho, JM. Coagulation activators. Dans: Feldman BF, Zinkl JG et Jain, eds. NC. *Schalm's Veterinary Hematology* 5th Ed. Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, 2000 ; 532-537.

Rush JE, Freeman LM, Fenollosa NK, Brown DJ. Population characteristics of cats with hypertrophic cardiomyopathy: 260 cases (1990-1999). *J Am Vet Med Assoc* 2002; 220: 202-207.

Schafer AI. The hypercoagulable states. *Ann Intern Med* 1985; 102: 814-828.

Simioni P, Prandoni P, Lensing AWA et al. The risk of recurrent venous thromboembolism in patients with an Arg⁵⁰⁶→Gln mutation in the gene for factor V (factor Leiden). *N Engl J Med* 1997; 336 : 399-403.

Stokol T, Brooks, MB, Erb HN, Mauldin GE. D-dimer concentrations in healthy dogs and dogs with disseminated intravascular coagulation. *Am J Vet Res* 2000; 61: 393-398.

Tilley LP, Liu S-K, Gilbertson SR et al. Primary myocardial disease in the cat. *Am J Pathol* 1977; 86 : 493-513.

Topper MJ, Prasse KW, Morris MJ, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for thrombin-antithrombin III complexes in horses. *Am J Vet Res* 1996; 57: 427-431.

Topper MJ, Prasse KW. Uses of enzyme-linked immunosorbent assay to measure thrombin-antithrombin III complexes in horses with colic. *Am J Vet Res* 1996; 57: 456-462.

Tripodi A, Mannucci PM. Markers of activated coagulation and their usefulness in the clinical laboratory. *Clin Chem* 1996; 42: 664-669.

Tsai L-M, Chen J-H, Tsao C-J. Relation of left atrial spontaneous echo contrast with prethrombotic state in atrial fibrillation associated with systemic hypertension, idiopathic dilated cardiomyopathy, or no identifiable cause (lone). *Am J Cardiol* 1998; 81: 1249-1252.

Wada H, Minamikawa K, Wakita Y et al. Increased vascular endothelial cell markers in patients with disseminated intravascular coagulation. *Am J Hematol* 1993; 44 : 85-88.

Wada H, Nagano T, Tomeoku et al. Coagulant and fibrinolytic activities in the leukemic cells lysates. *Thromb Res* 1982; 30: 315-322.

Wada H, Wakita Y, Shiku H. Tissue factor expression in endothelial cells in health and disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995; 6:S26-S31.

Welles EG, Boudreaux MK, Crager CS, Tyler EG. Platelet function and antithrombin, plasminogen and fibrinolytic activities in cats with heart disease. *Am J Vet Res* 1994; 55: 619-627.

Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998; 338: 1042-1050.

Yamamoto K, Ikeda U, Furuhashi K, et al. The coagulation system is activated in idiopathic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25: 1634-1640.

Yasaka M, Beppu S. Hypercoagulability in the left atrium: part II: coagulation factors. *J Heart Valve Dis* 1993; 2: 25-34.

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Bédard, Christian		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Pathologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Christian Bedard, Anne Lanevschi-Pietersma, Marilyn Dunn	
Titre Evaluation of markers of activated coagulation in plasma of healthy cats and in cats with primary myocardial disease	
Revue American Journal of Veterinary Research	Date de publication Soumis

DÉCLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Christian Bédard inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Evaluation of markers of activated coagulation in plasma of healthy cats and in cats with primary myocardial disease.</i>		
Coauteur Anne Lanevschi-Pietersma	Signature [REDACTED]	Date 22/05/03
Coauteur Marilyn Dunn	Signature [REDACTED]	Date 26/05/03
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

Envoyé à la FÉS le