



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>
Eprints ID : 14663

To cite this version :

Giraud, Léna. *Nuages de points anormaux dans la région des réticulocytes obtenus par cytométrie en flux chez des chiens atteints de babésiose : étude rétrospective de 92 cas*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVN, 2015, 47 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

NUAGES DE POINTS ANORMAUX DANS LA REGION DES RETICULOCYTES OBTENUS PAR CYTOMETRIE EN FLUX CHEZ DES CHIENS ATTEINTS DE BABESIOSE : ETUDE RETROSPECTIVE DE 92 CAS

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

GIRAUD Léna

Née, le 5 Septembre 1990 à Toulouse (31)

Directeur de thèse : Mme Catherine TRUMEL

JURY

PRESIDENT :

Mme Monique COURTADE-SAÏDI

Professeure à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mme Catherine TRUMEL

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mme Nathalie BOURGES-ABELLA

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directrice : **Madame Isabelle CHMITELIN**

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
- Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
- Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
- M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

- M. **DAHAN Julien**, *Médecine Interne*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
- M. **TANIS Jean-Benoît**, *Anatomie – Imagerie Médicale*

Remerciements

A Madame la Professeure Monique COURTADE-SAÏDI,

Professeur des Universités

Qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de thèse,
Hommages respectueux.

A Madame la Professeure Catherine TRUMEL,

Professeure de biologie médicale animale et comparée à l'ENVT,

Qui a accepté d'encadrer ce projet et pour m'avoir guidée dans la réalisation de cette thèse. Qu'elle
trouve ici toute l'expression de ma reconnaissance.

A Madame la Professeure Nathalie BOURGES-ABELLA

Maitre de Conférences Hors Classe en Histologie à l'ENVT,

Pour avoir accepté de prendre part à ce jury de thèse. Sincères remerciements.

Table des matières

Remerciements.....	3
LISTE DES ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION	8
Première partie : Généralités	10
1. La piroplasmose	11
1.1. Etiologie et épidémiologie.....	11
1.2. Cycle de vie de <i>Babesia sp.</i>	13
1.3. Pathogénie et signes cliniques	14
1.3.1. Pathogénie	14
1.3.2. Signes cliniques.....	15
1.4. Diagnostic.....	16
1.4.1 Identification microscopique	17
1.4.2 Diagnostic sérologique.....	18
1.4.3. Diagnostic PCR.....	19
2. Les analyseurs d'hématologie du type cytométrie de flux	20
2.1. Introduction – Historique.....	20
2.2. Principe.....	20
Deuxième partie : Etude rétrospective	22
1. Matériels et méthodes	23
2. Résultats.....	25
2.1. Chiens atteints de piroplasmose.....	25
2.1.1. Chiens présentant un nuage de réticulocytes normal	26
2.1.2. Chiens présentant un nuage de réticulocytes anormal.....	26
2.2. Chiens atteints d'une affection autre que la piroplasmose.....	28
2.3. Indices de fluorescence.....	29
Discussion	32
TABLE DES ILLUSTRATIONS	37
Bibliographie	38
ANNEXES	41

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribo Nucléique
ARN	Acide Ribo Nucléique
dL	Décilitres
ECVCP	European College of Veterinary Clinical Pathology
ENVT	Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
g	Grammes
Hg	Hémoglobine
HFR	High Fluorescence Reticulocytes
Ht	Hématocrite
IFI	Immuno Fluorescence Indirecte
IFR	Immature Reticulocyte Fraction
IM	Intra-musculaire
IR	Intervalle de référence
LFR	Low Fluorescence Reticulocytes
MFR	Medium Fluorescence Reticulocytes
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCV	Packed Cell Volume
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
µL	Microlitres

INTRODUCTION

La babésiose ou piroplasmose canine est une maladie vectorielle transmise par les tiques présente dans le monde entier ; par conséquent, les vétérinaires praticiens y sont souvent confrontés. Cette parasitose, due à un protozoaire intra-érythrocytaire du genre *Babesia*, est responsable d'un tableau clinique polymorphe incluant fréquemment hyperthermie, abattement et anorexie. La piroplasmose peut engager le pronostic vital de l'animal, d'où l'importance de réaliser un diagnostic précoce (3).

Classiquement, le diagnostic est fondé sur les données épidémiologiques et l'examen clinique du patient, et par l'observation microscopique des parasites. Pour ce faire, un frottis sanguin est réalisé à partir de sang veineux ou capillaire, puis coloré par des colorants de type Romanovski et observé au microscope pour attester de la présence de piroplasmes dans les hématies. Cependant, le diagnostic microscopique peut-être long et fastidieux, et requiert l'expertise d'un observateur expérimenté. Même dans ce cas, les faux négatifs sont fréquents, surtout lorsque la maladie est en début d'évolution.

Par ailleurs, les tests sérologiques ne sont pas utiles au diagnostic car la séroconversion n'a lieu qu'une à deux semaines après l'infection, donc souvent après l'apparition des symptômes. De plus la séroprévalence est importante en zone endémique ce qui peut augmenter le nombre de faux positifs (12). Enfin, l'utilisation de la PCR est possible pour diagnostiquer la babésiose, cependant les analyses doivent être réalisées dans un laboratoire et les résultats ne sont pas disponibles immédiatement. Ce n'est donc pas une solution optimale considérant l'importance de la précocité du diagnostic.

La démarche diagnostique inclut généralement un hémogramme réalisé par des automates d'hématologie. Le Sysmex XT-2000iV (Sysmex, Kobe, Japan) et moins fréquemment le Procyte DX (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) sont utilisés au Laboratoire Central de Biologie Médicale de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Récemment, il a été noté qu'un chien atteint de babésiose présentait des anomalies hématologiques : une pseudoréticulocytose et un nuage de points anormal dans la région des réticulocytes. Par ailleurs, de telles anomalies ont déjà été mises en évidence chez des patients humains atteints de malaria (qui est également un parasite intra-érythrocytaire), ainsi que chez certains chiens atteints de leucémie (14–16, 18, 25). L'objectif de cette étude était donc de déterminer si ces anomalies pourraient constituer un profil caractéristique chez les chiens atteints de piroplasmose.

Pour répondre à cette question, nous avons réalisé une étude rétrospective en examinant premièrement tous les hémogrammes de chiens atteints de babésiose afin de rechercher la présence d'un nuage de points anormal dans la zone des réticulocytes. Deuxièmement, en recherchant tous les hémogrammes présentant des nuages de points anormaux et en recherchant la cause de ces anomalies.

Première partie : Généralités

1. La piroplasmose

1.1. Etiologie et épidémiologie

Les piroplasmes sont des protozoaires qui parasitent les hématies de nombreux animaux domestiques et sauvages, ainsi que des humains (1). Bien que le terme 'babésiose' ne fasse référence qu'aux espèces du genre *Babesia*, il est aujourd'hui admis que les parasites du genre étroitement apparenté *Theileria* sont également capables d'infecter les chiens.

Ces deux genres, regroupés sous le terme de 'piroplasmes' appartiennent au phylum Apicomplexa, classe Piroplasma et à l'ordre des Piroplasmida. Ils sont structurellement, fonctionnellement et phylogénétiquement apparentés aux parasites responsables de la malaria (*Plasmodium spp*) chez l'homme (2). La maladie causée par ces agents est responsable de la destruction des hématies ce qui induit des manifestations cliniques variées, plus ou moins sévères.

Historiquement, la piroplasmose a été nommée d'après l'apparence prise par le parasite dans les érythrocytes (en forme de poire). Une dichotomie selon la taille relative des différents agents a alors permis d'identifier deux groupes : les piroplasmes dits 'grande forme' (2,5-5 μ m) et ceux dits 'petite forme' (1-2,5 μ m) (3). Par la suite le développement des techniques moléculaires a permis d'individualiser plusieurs espèces de piroplasmes pouvant atteindre les chiens. Elles sont regroupées dans le tableau ci-dessous :

Taille	Espèce	Vecteur	Distribution	Pathogénicité
Petite forme	<i>Babesia gibsoni</i>	<i>Haemaphysalis longicornis</i> , <i>Haemaphysalys bispinosa</i> , <i>Rhipicephalus sanguineus</i> ?	USA, Asie, Afrique, Australie, Europe	Modérée
	<i>Babesia conradae</i>	Inconnu	Californie	Modérée à sévère
	<i>Babesia microti-like</i> sp	<i>Ixodes ricinus</i> ? <i>Ixodes hexagonus</i> ?	Nord de l'Espagne, Est du Canada, USA	Modérée à sévère
	<i>Babesia equi</i>	Inconnu	Espagne, Croatie	Légère à modérée
Grande forme	<i>Babesia canis vogeli</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Partout dans le monde, climats tropicaux et subtropicaux	Légère
	<i>Babesia canis canis</i>	<i>Dermacentor</i> spp	Europe	Modérée
	<i>Babesia canis rossi</i>	<i>Haemaphysalis elliptica</i>	Afrique subsaharienne, Afrique du Sud	Sévère
	<i>Babesia</i> sp	Inconnu (réservoir sauvage ? vecteur tique ?)	Caroline du Nord	Modérée
	<i>Babesia</i> sp	Inconnu	Royaume Uni	Inconnue

Tableau 1: *Babesia* présentes le chien et leurs caractéristiques (3–5).

En Europe chez le chien, on retrouve les espèces *Babesia gibsoni*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis canis*, et *Babesia microti* aussi connue sous le nom de *Theileria annae*. *B. canis* est la plus répandue ce qui est en accord avec la large distribution de son vecteur *D. reticulatus* (6).

En France la piroplasmose est une maladie courante et elle est pour la majorité des cas due à *B. canis*. Les cas recensés sont plus nombreux au printemps et à l'automne ce qui correspond à la période où l'on retrouve le plus de tiques dans le milieu extérieur. De même, les animaux vivant en zone rurale ou suburbaine ont plus de risques de développer la maladie car les prairies et les zones de forêt sont des milieux propices à la prolifération des tiques. Récemment, il a été prouvé que *B. vogeli* était responsable d'infections dans le sud de la France bien que la prévalence soit encore inconnue (7).

1.2. Cycle de vie de *Babesia* sp.

Le cycle de vie des parasites *Babesia* est bien connu. Des sporozoïtes venant des glandes salivaires d'une tique infectée sont transmis au chien lors du repas sanguin, et rejoignent la circulation. La tique doit être en place depuis deux à trois jours avant que le parasite soit transmis au chien (4). Une fois que le parasite a rejoint le courant sanguin, il entre dans les hématies par endocytose, puis s'y multiplie au cours de phases répétées de reproduction asexuée. On peut avoir ainsi jusqu'à seize mérozoïtes créés par scission binaire dans une hématie. Cela aboutit à la destruction de celle-ci, les mérozoïtes rejoignent la circulation et peuvent à leur tour infecter d'autres hématies.

La tique quant à elle peut s'infecter au cours d'un repas sanguin sur un hôte parasitémique. Une fois dans la tique, le piroplasme continue à se développer au cours de différentes phases de maturation et de reproduction sexuée. Ainsi les mérozoïtes subissent dans la tique de nombreuses divisions résultant en la formation d'un zygote qui migre dans les glandes salivaires via l'hémolymphe. Les sporozoïtes sont créés dans les glandes salivaires à partir du zygote, et peuvent ensuite être transmis à un nouvel hôte lors d'un repas sanguin. Les zygotes peuvent aussi migrer dans les ovaires de la tique, ils seront ainsi transmis de façon trans-ovarienne à la prochaine génération de tiques (5).

La maladie peut également être transmise verticalement de la mère au chiot (8), ou par transfusion sanguine si le donneur est infecté (9). De plus, on pense que *B. gibsoni* peut être transmise au cours d'interactions agressives ou de morsures entre un chien infecté et un chien sain (10).

1.3. Pathogénie et signes cliniques

1.3.1. Pathogénie

Elle est déterminée en premier lieu par l'espèce et la souche de *Babesia* en cause. L'âge et le statut immunitaire de l'hôte sont également des facteurs importants à prendre en compte.

Suite à l'infection, l'animal atteint met en place une réponse immunitaire : les hématies parasitées exposent les antigènes du parasite à la surface de leur membrane plasmique, ce qui conduit à la production d'anticorps dirigés contre celles-ci. Les cellules infectées sont ensuite détectées par le système phagocytaire mononucléé et détruites par opsonisation (5).

D'autre part, dans certains cas le système immunitaire produit également des anticorps dirigés contre des molécules membranaires portées par des hématies saines, ce qui induit une anémie hémolytique à médiation immune (AHMI). Ce phénomène peut se mettre en place avec toutes les souches de *Babesia*. Cela induit une hémolyse qui perdure après l'administration d'un traitement adapté contre la piroplasmose. Cette complication peut être mise en évidence par la réalisation d'un test d'agglutination positif et/ou d'une sphérocytose observée au frottis. En revanche, un test de Coombs positif n'est pas un critère diagnostique fiable ; en effet, une étude a montré que 84% des chiens infectés par *B. canis* ou *B. gibsoni* ont un test de Coombs positif sans présenter d'AHMI (11). D'autres phénomènes contribuent à l'anémie classiquement objectivée lors de piroplasmose. Notamment, la simple action des parasites lorsqu'ils entrent dans la cellule et s'y divisent suffit à la fragiliser. De même, la peroxydation des lipides survenant en réponse au stress oxydatif est responsable d'une rigidité membranaire accrue des hématies saines et parasitées, ce qui induit leur destruction notamment lorsqu'ils passent dans le réseau capillaire (5).

Il faut savoir que le système immunitaire est souvent incapable d'éliminer complètement le parasite donc certains chiens restent porteurs chroniques asymptomatiques. De plus, la réponse immunitaire développée est spécifique de la souche impliquée ; il n'existe pas de phénomènes de protection croisée empêchant d'éventuelles ré-infestations (4).

1.3.2. Signes cliniques

Les signes cliniques induits par la piroplasmose sont liés à l'hémolyse intra et extra vasculaire se mettant en place habituellement 10 à 21 jours après une morsure par une tique infectée. Ils peuvent être responsable d'une maladie d'expression subclinique à suraiguë en fonction des cas (12).

Les manifestations cliniques les plus fréquentes de la piroplasmose sont très peu spécifiques ce qui rend le diagnostic parfois difficile. Les signes les plus rapportés sont de l'abattement, de l'anorexie et une hyperthermie > 39°C. Des signes plus spécifiques et assez fréquemment présents peuvent cependant orienter le clinicien, comme des muqueuses pâles ou ictériques, une modification de l'aspect des urines (pigmenturie due le plus souvent à une hémoglobinurie) ou une splénomégalie (6). D'autres symptômes plus rarement rapportés peuvent faire partie du tableau clinique comme des douleurs articulaires, des signes digestifs (vomissements ou diarrhée), de la polypnée ou des pertes d'équilibre (6). Enfin, des symptômes liés à des défaillances d'organes en lien avec l'état de choc que peut induire la maladie sont aussi à craindre et parfois difficiles à différencier de la maladie elle-même.

1.4. Diagnostic

Il est tout d'abord fondé sur une suspicion clinique, lorsqu'un chien présente un ou plusieurs des signes cliniques pré-cités. L'historique est également à prendre en compte, notamment si l'animal a été infesté par des tiques avant l'apparition des signes cliniques.

Des anomalies biochimiques et hématologiques peu spécifiques peuvent ensuite être notées. Au niveau de l'hémogramme, les modifications les plus souvent rencontrées chez les animaux atteints sont une anémie et une thrombopénie ; celle-ci pouvant d'ailleurs représenter la seule anomalie notable. Dans la plupart des cas, elle est accompagnée d'une anémie qui sera normochrome au départ pour devenir macrocytaire et hypochrome au fur et à mesure de la progression de la maladie. Le degré de réticulocytose observé sera proportionnel à la sévérité de l'anémie. Des anomalies diverses de la lignée blanche peuvent également être présentes, notamment une neutropénie.

Le test d'auto-agglutination sur lame ou le test de Coomb's seront parfois positifs. Cependant un test négatif ne permet pas d'exclure la maladie.

Il n'existe pas d'anomalies biochimiques plasmatiques ou urinaires pathognomoniques de piroplasmose, de même concernant l'analyse d'urine. On pourra parfois observer une hyperglobulinémie, une augmentation de l'activité des enzymes hépatiques ou de la créatinémie, une hyperbilirubinémie et/ou une hémoglobulinémie. A l'analyse d'urine, on notera des modifications telles qu'une bilirubinurie et/ou une hémoglobulinurie, une protéinurie. Ce sont encore une fois des marqueurs assez peu spécifiques, c'est pourquoi on ne peut se fonder sur ces examens seuls pour établir un diagnostic de certitude.

Il existe trois méthodes différentes utilisables pour réaliser un diagnostic de piroplasmose : l'identification microscopique des parasites, la sérologie et les analyses moléculaires. La sensibilité et la spécificité réelles de ces différents tests sont difficiles à établir mais il est important de retenir que l'on peut avoir des faux négatifs et des faux positifs avec chacun d'eux. Il n'existe donc pas de test diagnostique parfait en cas de piroplasmose, c'est pourquoi on recommande souvent de les coupler : la combinaison d'un test sérologique et d'une PCR semble offrir la meilleure sensibilité. Les recommandations actuelles sont donc de commencer par réaliser un test sérologique dans les cas suspects, à compléter le cas échéant par une PCR.

1.4.1 Identification microscopique

Il s'agit de l'observation microscopique d'un étalement sanguin fin. La détection visuelle des piroplasmose en position intra-érythrocytaire confirme le diagnostic et constitue la plupart du temps une preuve suffisante pour initier un traitement spécifique. Cette méthode est très spécifique mais elle reste peu sensible et on ne peut donc pas exclure la piroplasmose si aucun parasite n'est visualisé à la lecture du frottis ; en effet un taux de parasitémie d'au moins 0,001% est nécessaire pour détecter les parasites. Afin d'augmenter cette sensibilité il est recommandé de prélever du sang capillaire, par exemple à l'oreille, où la concentration de parasites serait plus importante. On peut également rechercher les *Babesia* sur le buffy coat car les hématies adjacentes ont plus de chances d'être parasitées. De plus, par cette méthode, l'identification précise de la souche est impossible, même si on peut avoir une suspicion de la localisation géographique et des signes cliniques manifestés par l'animal. *B. canis* se matérialise fréquemment sous la forme d'éléments piriformes présents dans les hématies seuls ou par paires. Cependant, il se peut que cette figure 'classique' ne soit pas la forme prédominante, notamment lorsque le parasite se réplique vite, et que l'on retrouve des formes plus atypiques de tailles différentes, de type amiboïde.

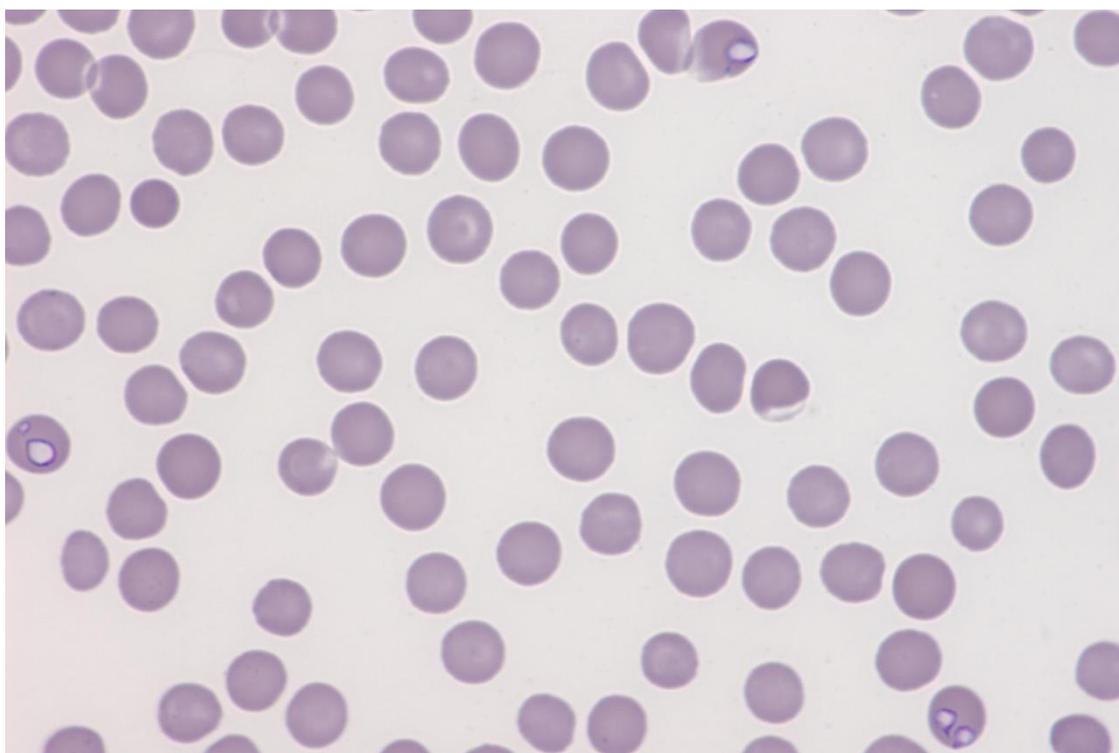


Photo 1 : Piroplasmose (*B. canis*) observés au microscope optique (x1000). Source : laboratoire central de l'ENVT.

1.4.2 Diagnostic sérologique

Il est parfois difficile de diagnostiquer la piroplasmose notamment chez les porteurs chroniques qui présentent des symptômes frustrés. C'est dans ce cas que la sérologie peut représenter un outil efficace : elle permet de repérer les individus qui sont en contact avec le parasite depuis assez longtemps pour avoir développé une réponse humorale. En revanche, chez les animaux atteints dans la phase aigüe de la maladie, la sérologie pourra se révéler négative car la réponse humorale n'aura pas eu le temps de se mettre en place ; en effet, il faut deux à trois semaines pour observer le premier pic détectable d'IgG (12).

Les tests sérologiques de type IFI ou immunofluorescence indirecte sont les plus utilisés dans le diagnostic de la piroplasmose canine, et ce depuis les années 1970. Ils permettent de mettre en évidence les anticorps anti-babesia grâce à des complexes spécifiques formés d'un anticorps couplé à un fluorochrome. Ces derniers se fixent aux immunoglobulines et on peut ainsi observer une fluorescence en microscopie électronique. Il existe cependant des réactions croisées entre les différentes espèces de piroplasmes, ce qui résulte en une moins bonne spécificité des tests. La PCR reste donc le seul moyen fiable d'identifier l'espèce responsable du tableau clinique. De même, certains anticorps synthétisés en réponse aux espèces de piroplasmes les plus récemment découvertes pourraient ne pas être détectés par les techniques IFAT conventionnelles, ce qui abaisse la sensibilité.

Il faut également savoir qu'en fonction du laboratoire et des techniques utilisées, les titres en anticorps et les seuils varient. De façon générale, pour *B. canis* il est admis qu'un titre en anticorps supérieur ou égal à 64 est en faveur d'une infection (5).

Comme cela a déjà été mentionné, la sérologie peut donner des résultats faussement négatifs (12). Pour augmenter la sensibilité des tests, il est recommandé de réaliser des sérologies couplées afin de mettre en évidence une séroconversion. Cependant, lors de manifestation aigüe, il n'est pas envisageable d'attendre plusieurs semaines avant d'établir un diagnostic et d'initier le traitement. Dans ce cas, la sérologie n'est donc pas le meilleur outil diagnostique.

1.4.3. Diagnostic PCR

C'est la méthode diagnostique la plus sensible et la plus spécifique à notre disposition. C'est également la seule méthode qui permet de réaliser l'identification précise de l'espèce en cause, en séquençant l'ADN du parasite ou en utilisant des protocoles spécifiques. Ainsi on peut aujourd'hui réaliser la distinction entre les différentes sous-espèces de *B. canis* par exemple (13).

Le plus souvent, ce sont des séquences spécifiques telles que l'ARN ribosomal 18S, 5,8S ou 28S ou les ITS (Internal Transcribed Spacers) qui sont utilisés pour réaliser un diagnostic PCR via des techniques telles que la nested-PCR ou la PCR RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

La nested-PCR ou PCR nichée permet grâce à deux étapes successives impliquant deux couples d'amorces différents, de réduire les risques de contamination et d'affiner la sensibilité du résultat. En effet, la seconde paire d'amorces amplifie une partie de la séquence amplifiée par la première, ce qui implique deux niveaux de spécificité.

La PCR RFLP permet quant à elle de comparer deux séquences d'ADN amplifiées grâce à l'utilisation d'enzymes de restriction. Ces enzymes coupent l'ADN au niveau d'une séquence donnée ce qui signifie que deux molécules d'ADN différentes ne seront pas fractionnées en un nombre égal de fragments.

Malgré la bonne sensibilité de cette méthode, les faux négatifs restent possibles notamment dans les cas de piroplasme chronique, et il est important de prendre cette limite en compte. Pour affiner la sensibilité on peut réaliser des PCR multiplexes, afin de rechercher plusieurs espèces ou de mettre en évidence des co-infections (5).

2. Les analyseurs d'hématologie du type cytométrie en flux

2.1. Introduction – Historique

Les analyseurs d'hématologie utilisés pour cette étude fonctionnent selon le principe de la cytométrie en flux. C'est une technologie qui permet la mesure simultanée de plusieurs caractéristiques physiques d'une cellule, dont les origines remontent au dix-neuvième siècle. Au départ, elle était réservée au suivi des patients immunodéprimés atteints du virus de l'immunodéficience acquise (VIH), et au diagnostic ainsi qu'au pronostic de certains cancers du sang. Cependant, les usages scientifiques de ces machines se sont multipliés, allant des analyses chromosomiques à l'hématologie clinique ou encore à la toxicologie

2.2. Principe

La cytométrie en flux est définie comme l'étude précise de cellules isolées entraînées par un flux rapide : c'est une technique de caractérisation individuelle, qualitative et quantitative de particules en suspension dans un liquide.

Pour fonctionner, un cytomètre en flux nécessite trois composantes :

- Fluidique, pour canaliser les cellules du spécimen afin de les amener une par une devant une source d'excitation.
- Optique : la source d'excitation et de récupération des signaux.
- Electronique : dans le but de convertir les signaux optiques en signaux électroniques et de les numériser pour les analyser avec un ordinateur.

Ainsi les cellules du spécimen à analyser circulent dans une gaine de fluide sous pression. Elles baignent dans une solution hypotonique ce qui permet de les rendre sphériques, et sont présentées une par une devant une source lumineuse, le plus souvent un laser. Les cellules soumises à ce dernier émettent des rayons réfléchis, réfractés ou diffractés. La position de ces rayons réfractés et diffractés ajoutée à l'intensité lumineuse résultante permet non seulement d'évaluer la taille de la cellule mais également sa composition. L'utilisation de la cytochimie permet d'affiner la reconnaissance cellulaire.

Les automates d'hématologie de type cytomètre en flux peuvent ainsi identifier et compter l'ensemble des cellules sanguines dont l'ensemble des leucocytes et les réticulocytes.

L'automate édite ensuite des graphiques accompagnants les résultats chiffrés.

- **Le graphique des réticulocytes du Sysmex**

Le Sysmex XT 2000 iV édite un graphique appelé RET où sont représentés les hématies, les réticulocytes et les plaquettes. Les réticulocytes correspondent au nuage de points évoquant une queue de comète régulière partant du nuage des hématies.

Les réticulocytes sont des hématies contenant de l'ARN. Elles perdent progressivement cet ARN au cours de leur maturation, devenant des hématies matures. Ainsi, le colorant fluorescent (la polyméthine dans le cas de nos deux automates) ajouté à la solution dans laquelle baignent les cellules, et qui a une forte affinité pour l'ARN, se lie plus fortement aux réticulocytes les plus immatures. Ces derniers émettront donc une fluorescence plus importante, ils sont qualifiés de HFR (High Fluorescence Reticulocytes) et se situeront dans la partie droite de la queue de comète. Les réticulocytes les plus matures auront peu d'ARN et auront donc une fluorescence peu importante (LFR) proche de celle des hématies. Enfin, les réticulocytes ayant des quantités intermédiaires d'ARN, auront une fluorescence intermédiaire (MFR) et se situeront au milieu de la queue de comète.

Une autre variable, l'IRF, est la somme des MFR et des HFR, et représente donc la fraction des réticulocytes immatures. Ces notions seront importantes pour la suite de l'étude, bien que seul le Sysmex donne accès à ces indices de fluorescence.

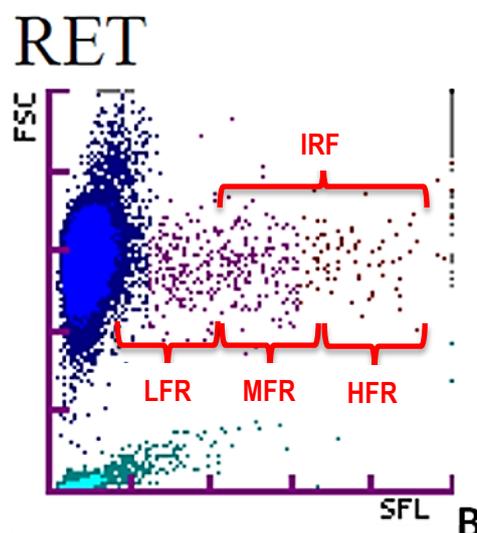


Figure 2 : Graphique classique représentant un cas d'anémie régénérative chez le chien (Sysmex).

Deuxième partie : Etude rétrospective

1. Matériels et méthodes

Cette étude rétrospective et descriptive a été réalisée au Laboratoire Central de Biologie Médicale de l'ENVT. Tous les hémogrammes de chiens obtenus avec le Sysmex XT-2000iV ou le Procyte DX entre Mars 2008 et Mai 2014 ont été examinés. Les hémogrammes indiquant des cas de babésiose diagnostiqués via l'observation microscopique des parasites ont ensuite été mis à part.

Tous les hémogrammes incluent entre autre des comptages leucocytaires et plaquettaires, cependant les variables importantes pour notre étude sont : le comptage des hématies, le taux d'hémoglobine, le microhématocrite (PCV) et l'hématocrite (calculé), le pourcentage de réticulocytes, le comptage réticulocytaire ainsi que le taux de réticulocytes corrigé.

Les deux analyseurs utilisés fonctionnent selon la même méthode, la cytométrie en flux, et utilisent le même colorant se liant à l'ARN (la polyméthine). Ils éditent de la même façon un graphique représentant les hématies et les réticulocytes sous la forme de nuages de points grâce à une coloration fluorescente. Le Sysmex donne en plus accès à des indices de fluorescence : le LFR, le MFR, le HFR, ainsi que l'IRF qui est la somme du MFR et du HFR.

Les hémogrammes comprennent systématiquement l'examen du frottis sanguin réalisé en parallèle de l'analyse chiffrée, afin d'évaluer notamment la morphologie des hématies. Pour chaque frottis, le degré de polychromatophilie a été subjectivement apprécié comme absent, modéré ou marqué et cette information a été transmise sur le rapport écrit.

Une anémie est considérée comme régénérative si le comptage des réticulocytes donné par l'analyseur est supérieur à la limite haute de l'intervalle de référence.

La totalité des hémogrammes concernant des chiens atteints de babésiose ont ensuite été analysés deux fois par deux observateurs différents : une vétérinaire en pathologie clinique (diplômée ECVCP) et une résidente en pathologie clinique toutes deux expérimentées et habituées à l'analyse des graphiques édités par les cytomètres en flux. Les nuages de points étaient considérés comme anormaux si une séparation complète entre les réticulocytes et les hématies était mise en évidence. Ils étaient également considérés anormaux si la densité de points des réticulocytes était plus élevée au milieu de la queue de comète qu'au départ de celle-ci, bien que la continuité entre les deux nuages soit respectée. Le but était de caractériser ces nuages anormaux pour les classer en profils distincts.

Lorsqu'ils étaient disponibles, les frottis sanguins ont été observés au microscope (x400), afin d'examiner toutes les hématies individuellement. Le nombre d'hématies parasitées par frottis était ainsi quantifié. Lorsque la parasitémie était importante, le comptage était stoppé quand le nombre d'hématies

parasitées dépassait mille. S'il y avait moins de mille hématies parasitées sur le frottis, tous les globules rouges du frottis étaient examinés.

Enfin, tous les hémogrammes réalisés avec le Sysmex et le Procyte entre Mars 2008 et Mai 2014 ont été revus une deuxième fois. Le but était d'identifier tous les chiens présentant un nuage de réticulocytes anormal sans pour autant être atteints de babésiose, comme le confirmait la lecture du frottis sanguin. Ces hémogrammes ont été analysés de la même façon que ceux des chiens atteints de babésiose, notamment les variables concernant les hématies et les réticulocytes, ainsi que le degré de polychromatophilie. Ces chiens étaient atteints d'autres affections dont le diagnostic était renseigné par leur dossier médical.

2. Résultats

2.1. Chiens atteints de piroplasmose

De Mars 2008 à Mai 2014, 6980 hémogrammes de chiens ont été réalisés au laboratoire de l'ENVT. Durant cette période, 92 cas de babésiose ont été recensés, ce qui suggère une fréquence de 1,32%. La plupart des chiens atteints (92%) présentaient également une thrombopénie ; cependant pour deux de ces chiens de nombreux amas plaquettaires ont été objectivés à la lecture du frottis. Par ailleurs, plus de la moitié des animaux atteints présentaient soit une leucopénie neutropénique, soit une leucopénie lymphopénique, soit les deux. Une lymphocytose et une monocytose ont également été observées chez un petit nombre de chiens (tableau 3).

Automate d'hématologie	Sysmex						Procyte					
	Médiane	Min	Max	IR (26)	n<IR	n>IR	Médiane	Min	Max	IR**	n<IR	n>IR
Hg (g/dL)	12,45	3,5	19	12,4-19,2	39/80		11,7	7,5	15,3	13,1-20,5	8/12	
Ht (microhématocrite ou hématocrite calculé*)	35	10	50	35-52	39/80		31,15	19,8	41,4	37,3-61,7	9/12	
% réticulocytes	0,49	0,13	6,69	0,3-2,37		6/80	0,5	0,1	1,9			
Taux de réticulocytes corrigé	0,34	0,11	3,38	Régénératif si > 1		9/80	0,38	0	0,8	Régénératif si > 1		
Leucocytes (10 ³ /μL)	5,08	0,73	13,72	5,6-20,4	46/80		3,77	1,86	11,31	5,05-16,76	9/12	
Neutrophiles (10 ³ /μL)	3,18	0,23	8,97	2,9-13,6	34/80		2,87	1,2	8,26	2,95-11,64	7/12	
Lymphocytes (10 ³ /μL)	0,99	0,08	6,66	1,1-5,3	43/80	3/80	0,63	0,06	2,34	1,05-5,1	8/12	
Monocytes (10 ³ /μL)	0,45	0,05	1,73	0,4-1,6		1/80	0,27	0,1	2,38	0,16-1,12		1/12
Plaquettes (10 ³ /μL)	14	2	250	64-613	73/80		8,5	0	54	148-848	12/12	

Tableau 3 : Résultats des hémogrammes de chiens atteints de babésiose. *Le microhématocrite n'est pas disponible pour les hémogrammes réalisés avec le Procyte. ** Les intervalles de référence utilisés pour le Procyte sont ceux donnés par le fabricant.

2.1.1. Chiens présentant un nuage de réticulocytes normal

Sur les 92 chiens infectés, 72 présentaient des profils réticulocytaires normaux, ce qui représente 78,3% des cas. Parmi ces 72 chiens, 34 présentaient une anémie (47,2%) qui était régénérative chez trois individus seulement, selon le comptage réticulocytaire : $167 \times 10^6/L$, $196 \times 10^6/L$ et $232 \times 10^6/L$. Tous les trois présentaient une polychromatophilie modérée à marquée.

Sur les 72 cas, seuls 34 frottis étaient disponibles. Parmi eux, 26 frottis comptaient moins de 1000 hématies parasitées [8-603]. Les 8 autres frottis comprenaient un nombre important d'hématies parasitées, soit plus de mille. Parmi eux :

- Un seul chien présentait une polychromatophilie marquée et une réticulocytose.
- Chez les 7 autres chiens le comptage réticulocytaire était dans l'intervalle de référence. Pour 4 d'entre eux, la polychromatophilie a été subjectivement définie comme absente. Les 3 autres présentaient une polychromatophilie modérée, et 2 de ces 3 derniers chiens avaient également une anémie modérée.

2.1.2. Chiens présentant un nuage de réticulocytes anormal

Sur les 92 cas de babésiose, 20 présentaient des profils réticulocytaires anormaux. Parmi ces différents profils, trois groupes ont été créés :

- Groupe 1 : 8 graphiques étaient caractérisés par une séparation complète entre le nuage des hématies et celui des réticulocytes, ou une continuité entre les deux nuages mais une densité de points plus importante au milieu de la 'queue de comète'.
- Groupe 2 : 3 graphiques étaient comparables à ceux du groupe 1, mais avec une densité de points moins importante.
- Groupe 3 : 9 graphiques présentaient des nuages de points ambigus ou suspicieux sans pour autant pouvoir être classés dans le groupe 2.

Les deux premiers groupes ont été définis facilement par les deux observateurs, mais les graphiques à inclure dans le troisième groupe ont fait l'objet de discussion avant d'arriver à un consensus.

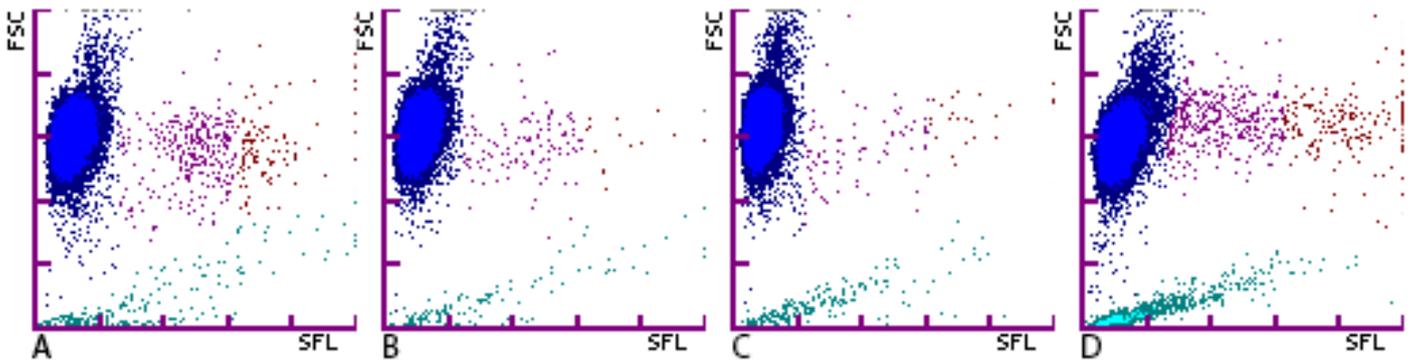


Figure 4 : Graphiques des anomalies caractéristiques rencontrées chez les chiens atteints de babésiose (Sysmex). **A**: Graphique représentatif des chiens du groupe 1. **B**: Groupe 2. **C**: Groupe 3. **D**: Graphique représentant une anémie régénérative.

Par ailleurs, dans la quasi-totalité des cas, le nuage anormal était observé au milieu de la 'queue de comète'. Dans un seul cas, l'anomalie était légèrement décalée vers la droite.

De plus, 14 des chiens qui présentaient un cytogramme anormal étaient anémiés, et 12 d'entre eux présentaient une polychromatophilie absente à légère. Dans les 2 autres cas, la polychromatophilie était modérée. Les 6 autres chiens n'étaient pas anémiés et la polychromatophilie était absente à légère. Parmi ces 6 chiens, un présentait une réticulocytose modérée ($161 \times 10^6/L$) sans anémie, mais pas de polychromatophilie. Ce qui suggère que la réticulocytose indiquée par l'analyseur n'est pas réelle puisque l'observation du frottis ne révèle pas ou peu de réticulocytes.

Seuls 16 frottis sanguins étaient disponibles sur les 20 cas recensés, dont 15 comprenaient un grand nombre d'hématies parasitées (>1000). Sur ces 15 cas on compte :

- 7 chiens du groupe 1
- 1 chien du groupe 2
- 6 chiens du groupe 3

Sur le dernier frottis, appartenant à un chien du groupe 2, seulement 315 hématies parasitées ont été mises en évidence. Cependant, ce frottis était de qualité médiocre.

2.2. Chiens atteints d'une affection autre que la piroplasmose

Sur tous les hémogrammes réalisés entre Mars 2008 et Mai 2014, 13 chiens avaient un nuage de réticulocytes anormal sans être atteints de babésiose. Ces 13 cas ont été classés de la même façon que les chiens ayant la piroplasmose, selon les trois groupes explicités ci-dessus : 4 chiens ont été inclus dans le groupe 1, 3 dans le groupe 2 et 6 dans le groupe 3.

Sur les 4 chiens du groupe 1, 3 étaient atteints de leucémie avec blastes circulants, et les nuages anormaux étaient alors déportés sur la droite du cytogramme. Le 4^{ème} chien avait un lymphome B centroblastique associé à une leucocytose marquée ($35,35 \times 10^3/\mu\text{L}$), due à une neutrophilie avec une courbe d'Arneth déviée à gauche, mais pas de blastes circulants.

Pour les chiens des autres groupes, aucune hypothèse n'a pu être avancée pour expliquer le profil anormal des réticulocytes. Néanmoins, un de ces chiens était un Cavalier King Charles qui présentait une thrombopénie à macroplaquettes, caractéristique de la race. Deux autres d'entre eux étaient admis pour une défaillance cardiaque, un avait un mélanome malin, un une duodénite, un autre une hépatopathie, et le dernier était donneur sanguin, donc en bonne santé. Il n'y a pas eu de PCR réalisée sur ces cas pour exclure la piroplasmose.

Deux des chiens du groupe 1 atteints de leucémie avaient une légère polychromatophilie et pour l'un d'eux l'analyseur décelait une réticulocytose ($503 \times 10^6/\text{L}$) non confirmée, d'après la distribution anormale des réticulocytes et l'examen du frottis sanguin.

Pour deux autres chiens de ce même groupe, l'un atteint de leucémie et l'autre d'un lymphome B, l'hémogramme révélait une polychromatophilie modérée à marquée.

Chez les chiens du groupe 2, deux individus ne présentaient pas de polychromatophilie, et un chien avait une polychromatophilie légère.

Chez les chiens du groupe 3, trois individus présentaient une polychromatophilie légère, et deux n'avaient pas de polychromatophilie.

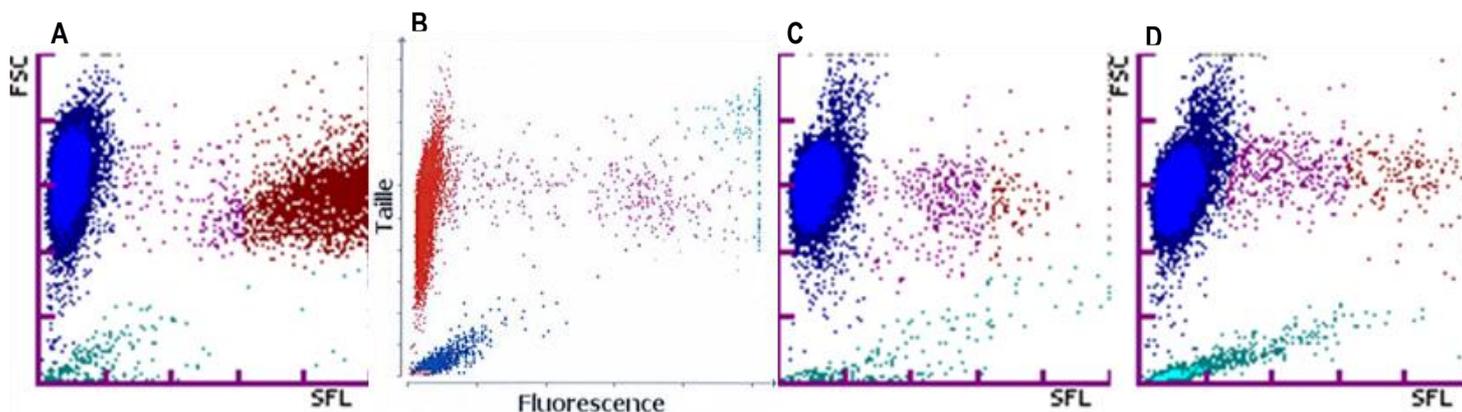


Figure 5 : Anomalie de la distribution des réticulocytes **A**: chez un chien atteint de leucémie (Sysmex). **B**: chez un chien atteint de leucémie (Procyte). **C**: chez un chien du groupe 1 atteint de babésiose. **D**: profil normal d'une anémie régénérative

2.3. Indices de fluorescence

Ces variables concernent tous les chiens inclus dans l'étude.

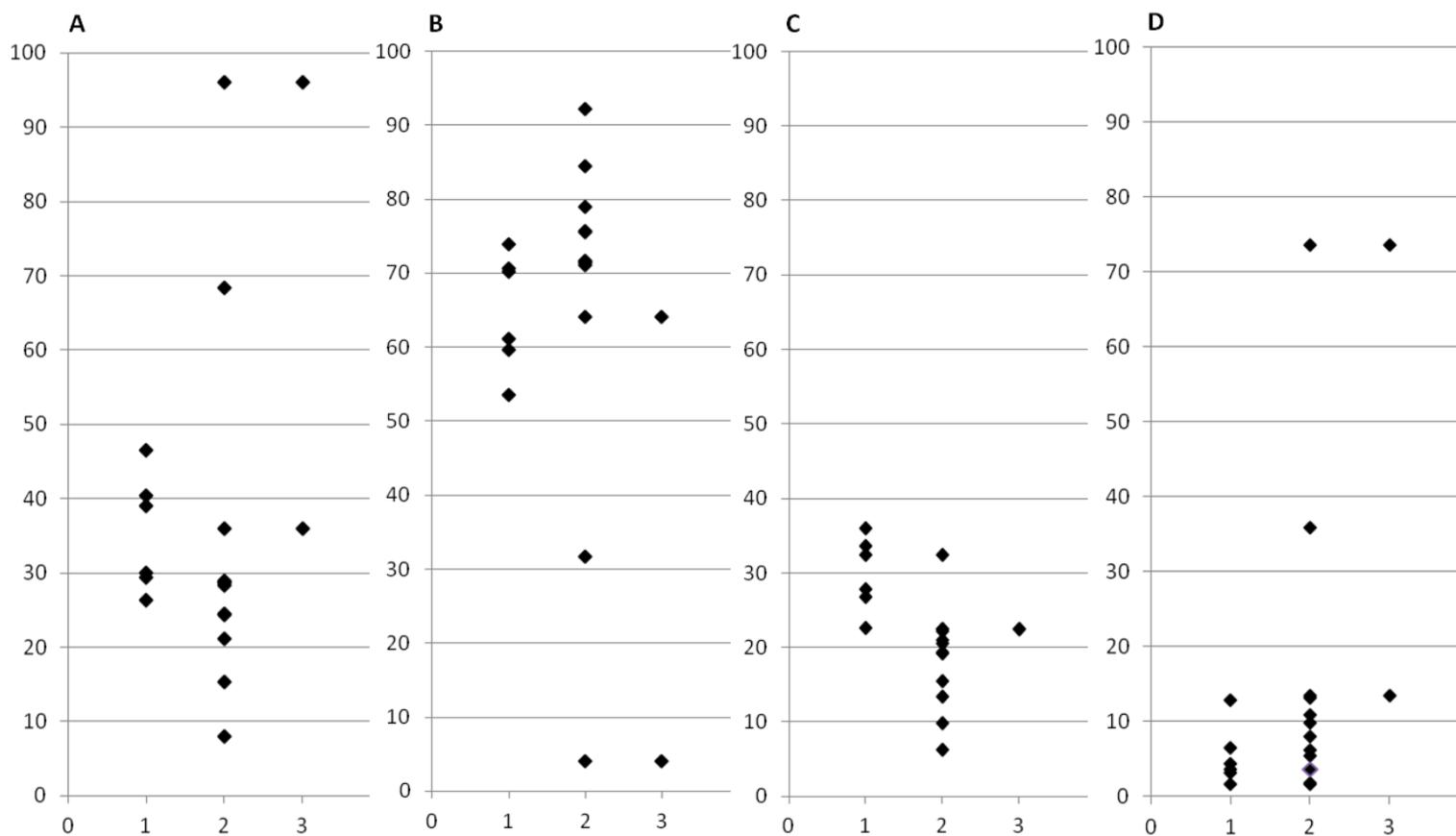
Chez les chiens atteints de babésiose et classés dans le groupe 1, le MFR tend à être plus élevé que les chiens atteints de babésiose des groupes 2 et 3, ou que chez les chiens présentant une anémie régénérative ; ou encore que les chiens présentant des nuages de réticulocytes anormaux sans être atteints de piroplasmose

L'analyse statistique des résultats obtenus n'a cependant pas pu être réalisée en raison du faible nombre de chiens inclus dans chaque groupe.

Chez un chien atteint de leucémie, le HFR était plus élevé que pour tous les autres chiens de l'étude. L'IFR était élevé chez tous les chiens présentant un MFR et/ou un HFR élevé. (tableau 6, graphique 7).

	% LFR	% MFR	% HFR	% IRF
Chiens atteints de babésiose présentant un profil de réticulocytes anormal				
Groupe 1	61.1	32.4	6.5	38.9
	70.1	26.8	3.1	29.9
	70.6	27.8	1.6	29.4
	53.5	33.6	12.9	46.5
	59.6	36.0	4.4	40.4
	73.8	22.6	3.6	26.2
	Groupe 2	87.7	11.0	1.3
	85.1	12.2	2.7	14.9
Groupe 3	80.0	16.8	3.2	20.0
	90.4	8.5	1.1	9.6
	80.3	16.5	3.2	19.7
	89.1	9.7	1.2	10.9
	76.6	10.9	12.5	23.4
	82.3	7.8	9.9	17.7
	74.7	22.2	3.1	25.3
Chiens atteints de babésiose présentant un profil de réticulocytes normal et une anémie régénérative				
	69.2	23.3	7.5	30.8
	81.4	13.6	5.0	18.6
Chiens présentant une anomalie du nuage des réticulocytes sans être atteints de babésiose				
Groupe 1	31.7	32.4	35.9	68.3
	4.0*	22.4*	73.6*	96.0*
	64.1*	22.5*	13.4*	35.9*
Groupe 2	75.5	20.9	3.6	24.5
	71.7	22.1	6.2	28.3
	71.5	20.5	8.0	28.5
Groupe 3	71.1	19.1	9.8	28.9
	71.3	15.5	13.2	28.7
	84.4	9.8	5.4	15.2
	92.1	6.2	1.7	7.9
	75.7	13.4	10.9	24.3
	78.9	19.3	1.8	21.1

Tableau 6 : Indices de fluorescence des réticulocytes HFR, MFR et LFR donnés par le Sysmex, pour tous les chiens présentant des profils anormaux ainsi que pour deux chiens ne présentant pas d'anomalie mais une anémie régénérative



Graphique 7 : Nuages de points illustrant les indices de fluorescence. **A:** IRF. **B:** LFR. **C:** MFR. **D:** HFR chez les chiens atteints de babésiose du groupe 1 (**1**), chez les chiens présentant un nuage anormal et une autre affection que la babésiose (**2**) et chez les chiens atteints de leucémie (**3**).

Discussion

Dans cette étude, nous avons montré que certains cas de piroplasmose associés à une parasitémie élevée pouvaient induire des anomalies caractéristiques, notamment un profil réticulocytaire anormal ainsi qu'une pseudoréticulocytose. De plus, nous avons montré que les indices de fluorescence fournis par le Sysmex pourraient être utiles pour distinguer les différentes causes de pseudoréticulocytose. En effet, les chiens atteints de babésiose avec un nuage de réticulocytes anormal tendaient à avoir un MFR plus élevé que les autres. Par ailleurs, en médecine humaine, des cas similaires de pseudoréticulocytose ont déjà été reportés chez des patients infectés par *Plasmodium falciparum*, agent de la malaria (14–16). Ce parasite également intra-érythrocytaire peut être comparé à ceux du genre *Babesia*. Une étude a montré que chez une personne fortement atteinte (avec un degré de parasitémie atteignant les 70%), l'analyseur dénombrait 21,6% de réticulocytes parmi les hématies (comptage absolu $92 \times 10^3 / \mu\text{L}$) (15). Néanmoins, le comptage manuel des réticulocytes après coloration du frottis sanguin au bleu de méthylène et observation microscopique a révélé un taux de réticulocytes de 4% ($16 \times 10^6 / \text{L}$). Selon toute vraisemblance, l'ARN des parasites était confondu par la machine avec l'ARN contenu dans les réticulocytes, la conduisant à inclure les hématies parasitées dans le comptage des réticulocytes. De la même façon, une autre étude a mis en évidence une pseudoréticulocytose indiquée par l'automate d'hématologie Cell-Dyn 4000 chez 23 parmi 46 patients atteints de malaria à *Plasmodium falciparum* (16). Cette erreur était presque exclusivement notée chez des patients dont plus de 0,5% des hématies étaient parasitées, et l'automate était là aussi induit en erreur par l'ARN du parasite présent dans les hématies. Ainsi les résultats donnés par cet analyseur pourraient contribuer à diagnostiquer la malaria, et ce rapidement, tout particulièrement dans les centres médicaux ne bénéficiant pas d'une expertise en maladies tropicales.

D'autre part, d'autres causes peuvent être à l'origine d'écarts de résultats entre les données de l'analyseur et celles du comptage manuel des réticulocytes. Parmi elles, on compte les macroplaquettes, les agrégats plaquettaires, la présence de leucocytes anormaux, la leucocytose ainsi que les fragments de leucocytes qui peuvent créer une pseudoréticulocytose (17, 18, 21–23). De plus, les corps de Heinz, les corps de Howell-Jolly, les corps de Pappenheimer ou les ponctuations basophiles pourraient également interférer avec l'énumération des réticulocytes par les analyseurs d'hématologie fonctionnant selon le principe de la cytométrie en flux (21, 24). Cependant, les frottis sanguins des chiens inclus dans cette étude ont été vérifiés, et aucune des raisons pré-citées n'a pu

être mise en cause pour expliquer l'anomalie du nuage des globules rouges. Il a donc été retenu que cela venait des hématies parasitées.

Des études précédentes ont ainsi montré que le comptage des réticulocytes était anormalement élevé patients humains leucémiques, ainsi que chez un chien atteint de leucémie dont les hémogrammes ont été réalisés le Sysmex XE-2100. Ce dernier présentait un nuage de réticulocytes complètement séparé de celui des rouges (17, 18), comme nous avons pu l'observer chez les chiens leucémiques inclus dans notre étude.

Chez des hommes atteints de leucémie, il a été démontré que des fragments de leucocytes détruits ou des leucocytes anormaux pouvaient se superposer au nuage des réticulocytes sur le graphique des hématies. Ces leucocytes se confondaient plus particulièrement avec la fraction immature des réticulocytes (IRF) incluant les HFR et les MFR. De fait, chez ces patients, l'IRF était anormalement élevé alors que ce sont normalement les LFR qui sont le plus représentés lors de réticulocytose vraie (17, 18). L'hypothèse avancée est que les leucocytes anormaux fixent moins le colorant (la polyméthine) et apparaissent donc moins fluorescent, ce qui les fait apparaître dans la région des réticulocytes plutôt que dans le cytogramme des leucocytes. Dans certains cas, les analyseurs affichaient cependant un message d'alerte spécifiant que le nuage des réticulocytes était anormal ('RET Abn Scattergram'). De façon similaire, chez un chien atteint de leucémie aigüe, une contradiction a pu être mise en évidence entre les résultats donnés par le Sysmex XT-2000iV concernant les réticulocytes, et la polychromatophilie (25). Chez ce chien, la distribution atypique des réticulocytes suggérait une erreur puisqu'il y avait 66% de HFR dénombrés par l'analyseur. Dans notre étude, le même phénomène a été observé chez deux chiens :

- un chien atteint de leucémie qui présentait un profil réticulocytaire anormal, un haut pourcentage de HFR et donc un IRF élevé, associé à un LFR anormalement bas.
- Un autre chien également atteint de leucémie, chez qui il a été noté que le nuage des réticulocytes présentait une anomalie caractérisée par une densité de points importante à l'extrême droite du cytogramme. Malheureusement les indices de fluorescence ne sont pas disponibles pour ce cas car l'hémogramme a été réalisé avec le Procyte, qui ne donne pas accès à ces valeurs.

Nous avons montré que des chiens atteints de babésiose et classés dans le groupe 1 ont tendance à avoir un MFR plus élevé et un HFR plus bas que les chiens atteints de leucémie. Pour expliquer cela, nous pensons que les hématies parasitées ont une fluorescence moins importante que les leucocytes anormaux des chiens leucémiques. Cette hypothèse est confortée par la faible affinité

des parasites pour le colorant fluorescent comparée à celle des fragments de leucocytes ou des leucocytes anormaux pour ce même colorant (21). Ainsi les hématies parasitées fixaient moins le colorant et apparaîtraient moins fluorescentes que les leucocytes anormaux, ce qui explique qu'on ne les retrouve pas au même endroit sur le cytogramme. Nous avons donc émis l'hypothèse que la localisation et la distribution de l'anomalie du nuage des réticulocytes pourrait varier en fonction de l'affection qui en est à l'origine.

Tous les chiens atteints de babésiose avec une anomalie dans la distribution des réticulocytes étaient hautement parasités (>1000 hématies/frottis), sauf un. Cependant, 8 chiens qui avaient un profil réticulocytaire normal présentaient aussi un haut degré de parasitémie. Chez un de ces chiens avec une réticulocytose vraie, il a été avancé que cette dernière pourrait masquer le nuage des hématies parasitées. Mais cela n'explique pas les 7 autres cas pour lesquels la réticulocytose et la polychromatophilie étaient absentes, et ne pouvaient donc pas masquer le nuage anormal. Une autre hypothèse est donc que le nombre d'hématies parasitées nécessaire à l'apparition de l'anomalie pourrait être bien supérieur à 1000. En effet une étude menée chez des gens atteints de malaria à *Plasmodium falciparum* a montré qu'il fallait qu'au moins 0,5% de la totalité des hématies soit parasitées pour voir apparaître la pseudoréticulocytose (16). Par conséquent, il se peut que ce soit le pourcentage de globule rouges parasités et non leur nombre absolu qui soit important pour voir apparaître la pseudoréticulocytose. Ainsi, en médecine humaine, et selon les recommandations de l'OMS, le diagnostic de la malaria passe par l'examen microscopique d'étalements sanguins fins et épais, associée à une analyse quantitative du buffy coat. Si des parasites sont observés et qu'une parasitémie supérieure à 0,5% de la totalité des hématies est attendue, la densité de parasites est exprimée en pourcentage d'érythrocytes infectés pour 2000 globules rouges observés sur un frottis finement étalé. Si moins de 0,5% des hématies totales sont parasitées, alors la densité de parasites est exprimée en nombre d'hématies infectées observées pour 100 globules blancs sur un étalement sanguin épais.

Cependant, d'autres investigations seront nécessaires pour déterminer si c'est bien le pourcentage de globules rouges infectés qui est important. Il serait également intéressant de calculer des pourcentages d'hématies parasitées afin de déterminer un pourcentage limite pour lequel la pseudoréticulocytose apparaît.

Cette étude a bien sur plusieurs limites, à commencer par le nombre d'individus inclus. Elle comprend en effet un faible nombre de chiens atteints de babésiose, ainsi qu'un faible nombre de

chiens atteints d'autres affections et présentant une pseudoréticulocytose. De plus, le fait de subdiviser encore les groupes en sous-groupes a encore réduit le nombre de représentants dans chacun d'eux, ce qui n'a pas permis de réaliser d'étude statistique de nos résultats. Enfin, deux analyseurs différents ont été utilisés, bien que leur principe de fonctionnement soit le même, et la méthodologie pour dénombrer les réticulocytes similaire. En effet, le Procyte ne donne pas accès aux indices de fluorescence et ces données n'étaient donc pas accessibles pour tous nos cas.

En conclusion, il semble que les anomalies du profil des réticulocytes, leur distribution ainsi que des indices de fluorescence atypiques pourraient aider les cliniciens à suspecter et diagnostiquer la piroplasmose. Ces résultats sont cependant à corrélérer avec des données hématologiques concordantes, comme une anémie, une thrombopénie ou une leucopénie. De plus, d'autres études seront nécessaires pour déterminer s'il existe une valeur seuil du pourcentage de parasitisme induisant une anomalie du profil des réticulocytes voir une pseudoréticulocytose. Il faudrait également conduire une étude plus large pour confirmer l'hypothèse que les indices de fluorescence peuvent être utiles pour aider à déterminer les différentes causes de pseudoréticulocytose. Il pourrait alors être intéressant de mettre en place des messages d'alerte sur les automates d'hématologie lorsque de telles anomalies sont observées, afin que les utilisateurs puissent plus facilement suspecter une maladie parasitaire sanguine.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, Catherine TRUMEL, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **GIRAUD Léna** intitulée « **Nuages de points anormaux dans la région des réticulocytes obtenus par cytométrie en flux chez des chiens atteints de babesiose : Etude rétrospective de 92 cas.** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 22 septembre 2015
Professeure Catherine TRUMEL
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



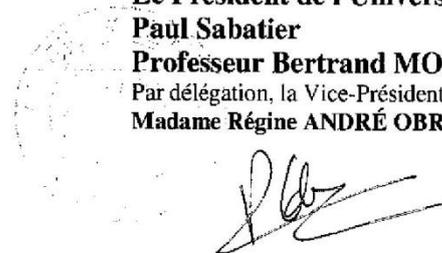
Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN



Vu :
Le Président du jury :
Professeure COURTADE-SAÏDI



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
Professeur Bertrand MONTHUBERT
Par délégation, la Vice-Présidente du CEVU
Madame Régine ANDRÉ OBRECHT



Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Photo 1 : Piroplasmes (<i>B. canis</i>) observés au microscope optique (x1000). Source : laboratoire central de l'ENVT.....	17
Figure 2 : Cytogramme classique représentant une anémie régénérative (Sysmex).....	21
Tableau 3 : Résultats des hémogrammes de chiens atteints de babésiose. *Le microhématocrite n'est pas disponible pour les hémogrammes réalisés avec le Procyte. ** Les intervalles de référence utilisés pour le Procyte sont ceux donnés par le fabricant.	25
Figure 4 : Cytogrammes des anomalies caractéristiques rencontrées chez les chiens atteints de babésiose (Sysmex). A : Cytogramme représentatif des chiens du groupe 1. B : Groupe 2. C : Groupe 3. D : Cytogramme représentant une anémie régénérative.....	27
Figure 5 : Anomalie de la distribution des réticulocytes A : chez un chien atteint de leucémie (Sysmex). B : chez un chien atteint de leucémie (Procyte). C : chez un chien du groupe 1 atteint de babésiose. D : profil normal d'une anémie régénérative.....	29
Tableau 6 : Indices de fluorescence des réticulocytes HFR, MFR et LFR donnés par le Sysmex, pour tous les chiens présentant des profils anormaux ainsi que pour deux chiens ne présentant pas d'anomalie mais une anémie régénérative.....	30
Graphique 7 : Nuages de points illustrant les indices de fluorescence. A : IRF. B : LFR. C : MFR. D : HFR chez les chiens atteints de babésiose du groupe 1 (1), chez les chiens présentant un nuage anormal et une autre affection que la babésiose (2) et chez les chiens atteints de leucémie (3).	31

Bibliographie

1. HUNFELD, K, HILDEBRANDT, A et GRAY, J. Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *International Journal for Parasitology*. septembre 2008. Vol. 38, n° 11, pp. 1219-1237.
2. SOLANO-GALLEGO, Laia et BANETH, Gad. Babesiosis in dogs and cats—Expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary Parasitology*. septembre 2011. Vol. 181, n° 1, pp. 48-60.
3. IRWIN, Peter J. Canine babesiosis. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. novembre 2010. Vol. 40, n° 6, pp. 1141-1156.
4. AYOUB, Ashley L., HACKNER, Susan G. et PRITTIE, Jennifer. Clinical management of canine babesiosis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio, Tex.: 2001)*. février 2010. Vol. 20, n° 1, pp. 77-89. PMID: 20230437
5. GREENE, Craig E. *Infectious diseases of the dog and cat*. St. Louis, Mo. : Elsevier/Saunders, 2012.
6. RENÉ-MARTELLET, M., CHÊNE, J., CHABANNE, L., CHALVET-MONFRAY, K. et BOURDOISEAU, G. Clinical signs, seasonal occurrence and causative agents of canine babesiosis in France: Results of a multiregional study. *Veterinary Parasitology*. octobre 2013. Vol. 197, n° 1-2, pp. 50-58.
7. RENÉ, M., CHÊNE, J., BEAUFILS, J. P., VALIENTE MORO, C., BOURDOISEAU, G., MAVINGUI, P. et CHABANNE, L. First evidence and molecular characterization of *Babesia vogeli* in naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in southern France. *Veterinary Parasitology*. 6 juillet 2012. Vol. 187, n° 3-4, pp. 399-407. PMID: 22342131
8. MIERZEJEWSKA, Ewa J., WELC-FALEĆIAK, Renata, BEDNARSKA, Małgorzata, RODO, Anna et BAJER, Anna. The first evidence for vertical transmission of *Babesia canis* in a litter of Central Asian Shepherd dogs. *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM*. 2014. Vol. 21, n° 3, pp. 500-503. PMID: 25292117
9. STEGEMAN, Julie R., BIRKENHEUER, Adam J., KRUGER, John M. et BREITSCHWERDT, Edward B. Transfusion-associated *Babesia gibsoni* infection in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1 avril 2003. Vol. 222, n° 7, pp. 959-963, 952. PMID: 12685786
10. JEFFERIES, R., RYAN, U. M., JARDINE, J., BROUGHTON, D. K., ROBERTSON, I. D. et IRWIN, P. J. Blood, Bull Terriers and Babesiosis: further evidence for direct transmission of *Babesia gibsoni* in dogs. *Australian Veterinary Journal*. novembre 2007. Vol. 85, n° 11, pp. 459-463. PMID: 17970851
11. FARWELL, G. E., LEGRAND, E. K. et COBB, C. C. Clinical observations on *Babesia gibsoni* and *Babesia canis* infections in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1 mars 1982. Vol. 180, n° 5, pp. 507-511. PMID: 7061333
12. KUBELOVÁ, Michaela, SEDLÁK, Kamil, PANEV, Aleksandar et ŠIROKÝ, Pavel. Conflicting results of serological, PCR and microscopic methods clarify the various risk levels of canine babesiosis in Slovakia: A complex approach to *Babesia canis* diagnostics. *Veterinary Parasitology*. janvier 2013. Vol. 191, n° 3-4, pp. 353-357.

13. DUARTE, Sabrina Castilho, LINHARES, Guido Fontgalland Coelho, ROMANOWSKY, Tatiana Nunes, DA SILVEIRA NETO, Osvaldo José et BORGES, Ligia Miranda Ferreira. Assessment of primers designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi* by PCR assay. *Veterinary Parasitology*. 25 mars 2008. Vol. 152, n° 1-2, pp. 16-20. PMID: 18242863
14. HOFFMANN, JJML et PENNING, J. M. A. Pseudo-reticulocytosis as a result of malaria parasites. *Clinical & Laboratory Haematology*. 1999. Vol. 21, n° 4, pp. 257-260.
15. LAURENCET, France M., MARTINEZ, Thelmo et BERIS, Photis. Spurious Extreme Reticulocytosis with an Automated Reticulocyte Analyzer. *New England Journal of Medicine*. 25 décembre 1997. Vol. 337, n° 26, pp. 1922-1923.
16. WEVER, P. C., HENSKENS, Y. M. C., KAGER, P. A., DANKERT, J. et VAN GOOL, T. Detection of Imported Malaria with the Cell-Dyn 4000 Hematology Analyzer. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 décembre 2002. Vol. 40, n° 12, pp. 4729-4731.
17. KIM, Ahhyun, PARK, Joonhong, KIM, Myungshin, LIM, Jihyang, OH, Eun-Jee, KIM, Yonggoo, PARK, Yeon-Joon et HAN, Kyungja. Correction of Pseudoreticulocytosis in Leukocytosis Samples Using the Sysmex XE-2100 Analyzer Depends on the Type and Number of White Blood Cells. *Annals of Laboratory Medicine*. novembre 2012. Vol. 32, n° 6, pp. 392-398.
18. HUH, Jungwon, MOON, Heewon et CHUNG, Whasoon. Erroneously elevated immature reticulocyte counts in leukemic patients determined using a Sysmex XE-2100 hematology analyzer. *Annals of Hematology*. 22 août 2007. Vol. 86, n° 10, pp. 759-762.
19. HODGES, Joanne et CHRISTOPHER, Mary M. Diagnostic accuracy of using erythrocyte indices and polychromasia to identify regenerative anemia in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2011. Vol. 238, n° 11, pp. 1452-1458.
20. LILLIEHÖÖK, Inger et TVEDTEN, Harold. Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. I. Erythrocytes, platelets, and total leukocyte counts. *Veterinary Clinical Pathology*. juin 2009. Vol. 38, n° 2, pp. 163-174.
21. ZANDECKI, M., GENEVIEVE, F., GERARD, J. et GODON, A. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part I: platelets. *Clinical and Laboratory Haematology*. février 2007. Vol. 29, n° 1, pp. 4-20.
22. PAPPAS, A. A., OWENS, R. B. et FLICK, J. T. Reticulocyte counting by flow cytometry. A comparison with manual methods. *Annals of Clinical and Laboratory Science*. avril 1992. Vol. 22, n° 2, pp. 125-132.
23. VILLAMOR, N., KIRSCH, A., HUHN, D., VIVES-CORRONS, J. L. et SERKE, S. Interference of blood leucocytes in the measurements of immature red cells (reticulocytes) by two different (semi-) automated flow-cytometry technologies. *Clinical and Laboratory Haematology*. juin 1996. Vol. 18, n° 2, pp. 89-94.
24. ESPAÑOL, Ignacio, PEDRO, Carmen et REMACHA, Angel F. Heinz bodies interfere with automated reticulocyte counts. *Haematologica*. 1999. Vol. 84, n° 4, pp. 373-374.
25. TVEDTEN, Harold. What is your diagnosis? Discrepancy between Sysmex XT-2000iV reticulocyte count and polychromasia: Sysmex XT-2000iV reticulocyte counts. *Veterinary Clinical Pathology*. juin 2011. Vol. 40, n° 2, pp. 275-276.

26. BOURGÈS-ABELLA, Nathalie, GEFFRÉ, Anne, CONCORDET, Didier, BRAUN, Jean-Pierre et TRUMEL, Catherine. Canine reference intervals for the Sysmex XT-2000iV hematology analyzer: Canine reference intervals for the Sysmex. *Veterinary Clinical Pathology*. septembre 2011. Vol. 40, n° 3, pp. 303-315.

ANNEXES

Chiens atteints de babésiose : résultats d'héogramme

	N° héogramme	N° dossier patient	Hg (g/dL)	PLT (10 ³ /μl) - impédance	GB (10 ³ /μL)	GNN (%)	GNN (10 ³ /μL)	Lympho (%)	Lympho (10 ³ /μL)	Mono (% manuel)	Mono (10 ³ /μL)	Rétic (%)	Rétic (10 ⁶ /μL)	Rétic (% manuel)	Rétic (Tx corrigé)	IRF (%)	LFR (%)	MFR (%)	HFR (%)
2008	08-2023	T07-3451	11,10	14,00	2,61	58,00	1,51	36,00	0,94	6	0,16	0,66	0,0297	*	*	9,6	90,4	8,5	1,1
	08-2041	T06-4086	11,00	11,00	3,16	70,00	2,21	16,00	0,51	14	0,44	0,42	0,0201	*	*	11,7	88,3	7,5	4,2
	08-3560	T08-2510	5,30	8,00	4,31	53,00	2,28	35,00	1,51	12	0,52	1,42	0,0359	14,00	0,50	19,6	80,4	12,9	6,7
	08-4892	T08-3963	14,50	14,00	4,32	86,00	3,72	9,00	0,39	5	0,22	0,23	0,0142	*	*	12,3	87,7	9,2	3,1
	08-5493	T08-4566	9,40	12,00	7,35	30,00	2,21	55,00	4,04	14	1,03	0,55	0,0229	5,50	0,30	25	75	12,2	12,8
	08-5616	T07-3556	16,40	5,00	3,23	64,00	2,07	20,00	0,65	16	0,52	0,46	0,0315	*	*	2,3	97,7	0,8	1,5
	08-5742	T08-3057	9,60	14,00	8,26	67,00	5,53	22,00	1,82	11	0,91	0,69	0,0284	*	0,36	22,2	77,8	16,5	5,7
	08-5834	T07-2527	14,50	15,00	5,32	74,00	3,94	18,00	0,96	8	0,43	0,22	0,0135	*	*	16,2	83,8	9,7	6,5
2009	09-144	T07-1316	12,70	4,00	6,65	37,00	2,46	54,00	3,59	9	0,60	0,41	0,0227	*	*	23,5	76,5	8,7	14,8
	09-172	T08-464	8,90	12,00	2,12	46,00	0,98	17,00	0,36	37	0,78	0,45	0,0166	*	0,25	23,4	76,6	10,9	12,5
	09-207	T01-16861	14,20	9,00	3,41	68,00	2,32	19,00	0,65	13	0,44	0,51	0,0312	*	*	13,7	86,3	9,6	4,1
	09-295	T09-260	12,00	19,00	2,14	88,00	1,88	7,00	0,15	5	0,11	0,52	0,0281	*	*	14,9	85,1	12,2	2,7
	09-484	T09-446	12,70	16,00	7,32	36,00	2,64	55,00	4,03	9	0,66	0,3	0,0159	*	*	23,8	76,2	14,3	9,5
	09-1224	T07-3832	10,80	5,00	13,72	47,00	6,45	44,00	6,04	9	1,23	1,93	0,0872	*	1,24	23,2	76,8	18,9	4,3
	09-1238	T09-1122	11,00	5,00	13,33	66,00	8,80	20,00	2,67	13	1,73	0,5	0,0257	5,00	0,35	20,5	79,5	17,7	2,8
	09-1373	T09-1251	5,90	4,00	6,78	37,00	2,51	55,00	3,73	7	0,47	6,69	0,196	*	2,97	21,9	78,1	16	5,9
	09-1438	T09-1316	8,70	33,00	7,27	87,00	6,32	6,00	0,44	7	0,51	6,08	0,2316	*	3,38	18,6	81,4	13,6	5
	09-1619	T02-2641	17,00	17,00	8,24	61,00	5,03	31,00	2,55	8	0,66	0,17	0,0124	*	*	14,3	85,7	10,2	4,1
	09-2746	T08-1315	8,40	12,00	1,15	82,00	0,94	11,00	0,13	6	0,07	0,29	0,0106	*	0,15	4,9	95,1	4,9	0
2010	10-701	T05-2798	13,90	49,00	4,89	44,00	2,15	55,00	2,69	11	0,54	0,34	0,019	*	*	10,5	89,5	6,3	4,2
	10-1022	T10-864	14,20	13,00	2,71	79,00	2,14	7,00	0,19	13	0,35	1,93	0,1007	*	*	29,4	70,6	27,8	1,6
	10-1026	T10-864	12,70	10,00	8,65	80,00	6,92	11,00	0,95	9	0,78	0,91	0,0435	*	*	16,7	83,3	13,6	3,1
	10-1135	T02-2641	17,90	23,00	5,46	73,00	3,99	21,00	1,15	6	0,33	0,13	0,0096	*	*	8,1	91,9	5,4	2,7
	10-1258	T10-1109	41,10	41,00	6,52	60,00	3,91	32,00	2,09	6	0,39	2,93	0,1392	*	*	38,5	61,5	22,2	16,3

	10-1646	T07-2031	12,30	38,40	4,38	80,00	3,50	15,00	0,66	5	0,22	0,36	0,0175	*	*	21,8	78,2	8,9	12,9
	10-2280	T08-2487	14,80	20,00	3,43	87,00	2,98	11,00	0,38	2	0,07	0,43	0,0252	*	*	11,6	88,4	9,9	1,7
	10-2352	T10-2044	4,00	6,00	1,34	57,00	0,76	15,00	0,20	56	0,75	1,9	0,0346	*	*	25,3	74,7	22,2	3,1
	10-3033	T10-1662	16,00	158,00	7,52	53,00	3,99	21,00	1,58	8	0,60	0,13	0,0086	*	*	5,6	94,4	5,6	0
	10-3300	T10-2954	10,60	103,00	7,94	52,00	4,13	36,00	2,86	11	0,87	1,96	0,0906	*	*	18,2	81,8	14,1	4,1
	10-4594	T10-4340	7,40	16,00	5,44	68,00	3,70	17,00	0,92	2	0,11	0,9	0,0309	*	*	*	*	*	*
	10-4992	T10-4744	3,50	7,00	8,12	75,00	6,09	19,00	1,54	6	0,49	3,06	0,0438	3,06	0,68	46,5	53,5	33,6	12,9
2011	11-445	T11-374	11,80	26,00	7,48	63,00	4,71	32,00	2,39	5	0,37	0,48	0,0248	0,48	0,34	11,9	88,1	8,9	3
	11-631	T11-408	13,20	16,00	7,78	50,00	3,89	47,00	3,66	3	0,23	0,33	0,0177	0,33	*	20,7	79,3	12	8,7
	11-1515	T11-1289	13,80	19,00	10,34	63,00	6,51	30,00	3,10	7	0,72	0,32	0,0167	*	*	23,6	76,4	16,9	6,7
	11-2503	T08-4588	13,80	9,00	4,97	62,00	3,08	22,00	1,09	15	0,75	0,26	0,0148	*	*	15	85	6,8	8,2
	11-2510	T11-2248	7,00	6,00	5,98	81,00	4,84	10,00	0,60	9	0,54	0,28	0,0076	*	0,10	15	85	8,2	6,8
	11-3504	T11-3221	6,80	79,00	7,46	75,00	5,60	11,60	0,87	19	1,42	0,7	0,0179	*	*	*	*	*	*
	11-4861	T09-2261	13,00	12,00	2,95	87,00	2,57	11,00	0,32	2	0,06	0,16	0,0086	*	*	19,5	80,5	15,2	4,3
	11-5397	T11-5790	16,50	35,00	11,87	35,00	4,15	51,00	6,05	4	0,47	0,5	0,0037	*	*	17,2	82,8	12,9	4,3
	11-5474	T11-5881	10,10	13,00	7,32	6,00	0,44	91,00	6,66	3	0,22	0,55	0,0227	0,55	0,34	20,6	79,4	14,8	5,8
	11-5528	T04-629	12,00	12,00	3,57	89,00	3,18	3,00	0,11	8	0,29	0,92	0,0423	0,90	0,60	21,4	78,6	19,9	1,5
	11-5543	T11-860	12,40	69,00	5,94	76,00	4,51	19,00	1,13	5	0,30	0,46	0,0226	*	*	25,2	74,8	18,1	7,1
	11-5555	T10-1246	10,20	10,00	4,30	81,00	3,48	6,00	0,26	13	0,56	0,43	0,017	0,40	0,25	11,6	88,4	9,1	2,5
	11-5604b	T11-6160																	
	11-5804	T11-6311	14,10	10,00	6,28	90,00	5,65	4,00	0,25	6	0,38	0,5	0,0301	*	*	17,7	82,3	7,8	9,9
	11-5896	T08-3201	13,90	22,00	9,05	55,00	4,98	35,00	3,17	9	0,81	0,35	0,0201	*	*	21,4	78,6	14,3	7,1
2012	12-57	T12-37	16,90	12,00	6,30	79,00	4,98	18,00	1,13	3	0,19	0,68	0,047	*	*	27,2	72,8	18,8	8,4
	12-300	T11-4028	13,50	24,00	6,16	47,00	2,90	47,00	2,90	6	0,37	0,29	0,0155	0,29	0,23	4,9	95,1	1,2	3,7
	12-659	T12-674	9,20	8,00	1,25	79,00	0,99	16,00	0,20	5	0,06	0,54	0,0204	0,50	0,30	12,3	87,7	11	1,3
	12-797	T07-25	17,50	22,00	3,39	73,00	2,47	24,00	0,81	3	0,10	0,44	0,0328	*	*	17,5	82,5	13,5	4
	12-1426	T12-1479	10,00	9,00	3,18	50,00	1,59	34,00	1,08	10	0,32	0,39	0,016	0,40	*	29,7	70,3	23,4	6,3

	12-1914	T12-645	19,00	51,00	0,73	31,00	0,23	55,00	0,40	14	0,10	0,97	0,0748	*	*	26,7	73,3	18,8	7,9
	12-1928	T12-2025	15,60	25,00	6,00	70,00	4,20	17,00	1,02	13	0,78	0,34	0,023	*	*	9,4	90,6	5,2	4,2
	12-2412	T09-2261	13,40	39,00	3,05	95,00	2,90	3,00	0,09	2	0,06	0,33	0,0186	*	*	11,7	88,3	11,7	0
	12-4424	T02-3625	13,90	32,00	5,39	90,00	4,85	4,00	0,22	6	0,32	2,74	0,1611	*	*	40,4	59,6	36	4,4
	12-4601	T12-5533	13,70	13,00	4,74	60,00	2,84	32,00	1,52	13	0,62	0,14	0,0077	*	*	12,8	87,2	5,1	7,7
	12-4672	T08-829	11,20	8,00	11,31	70,00	7,92	11,50	1,30	21	2,38	0,1	0,0049	*	*	*	*	*	*
	12-5254	T09-644	12,30	100,00	3,69	81,00	2,99	10,00	0,37	9	0,33	0,35	0,0175	*	*	10,3	89,7	10,3	0
	12-5352	T10-806	16,70	10,00	3,09	64,00	1,98	21,00	0,65	15	0,46	0,55	0,0373	*	*	10,2	89,8	8,3	1,9
	12-5416	T08-4514	18,50	12,00	8,86	58,00	5,14	39,00	3,46	3	0,27	0,27	0,0211	*	*	17,1	82,9	9,2	7,9
	12-5463	T12-6394	10,40	4,00	4,64	75,50	3,50	6,70	0,31	8	0,37	1,9	0,0826	*	1,19	*	*	*	*
	12-5522	T12-6456	9,40	16,00	8,36	44,00	3,68	43,00	3,59	13	1,09	0,76	0,0318	0,76	0,50	33,5	66,5	23,1	10,4
	12-559?	T12-799	11,10	34,00	4,07	70,00	2,85	20,00	0,81	9	0,37	1,43	0,0661	*	*	28,4	71,6	19,7	8,7
	12-5626	T09-4945	11,20	21,00	2,10	82,00	1,72	8,00	0,17	9	0,19	0,58	0,0301	0,50	?	10,9	89,1	9,7	1,2
	12-5654	T09-4945	9,70	13,00	4,48	67,00	3,00	17,00	0,76	12	0,54	0,34	0,0151	0,34	0,20	15,4	84,6	7,2	8,2
	12-5957	T12-6835	9,40	33,00	4,02	54,00	2,17	40,00	1,61	3	0,12	0,49	0,0193	0,49	?	14,6	85,4	10,2	4,4
2013	13-120	T13-89	6,90	4,00	5,18	48,00	2,49	42,00	2,18	10	0,52	0,55	0,0171	0,50	0,20	27,6	72,4	21,2	6,4
	13-135	T13-96	11,90	32,00	5,36	63,00	3,38	21,00	1,13	16	0,86	0,27	0,0126	*	*	19,7	80,3	9,2	10,5
	13-140	T10-1401	13,50	35,00	3,29	82,10	2,70	9,40	0,31	3	0,10	0,3	0,0196	*	*	*	*	*	*
	13-182	T13-138	12,90	9,00	3,42	49,40	1,69	17,00	0,58	11	0,38	0,4	0,0234	*	*	*	*	*	*
	13-1022	T11-4655	15,40	6,00	2,63	74,00	1,95	17,00	0,45	9	0,24	0,36	0,0213	*	*	21,8	78,2	19,8	2
	13-1551	T11-5518	9,10	6,00	3,87	61,00	2,36	20,00	0,77	9	0,35	1,66	0,0599	0,06	?	26,2	73,8	22,6	3,6
	13-1682	T09-2261	14,10	2,00	3,17	90,30	2,86	4,40	0,14	4	0,13	0,3	0,0184	*	*	*	*	*	*
	13-196?	T10-5224	11,90	23,00	5,69	50,00	2,85	37,00	2,11	13	0,74	0,44	0,0205	*	0,30	20	80	16,8	3,2
	13-2142	T05-3162	18,30	12,00	7,46	51,00	3,80	34,00	2,54	14	1,04	0,67	0,0506	*	*	16,9	83,1	12,7	4,2
	13-2190	T13-2005	7,70	2,00	2,82	36,00	1,02	43,00	1,21	18	0,51	0,76	0,0248	0,90	?	38,9	61,1	32,4	6,5
	13-2375	T12-6341	11,10	6,00	4,51	56,00	2,53	31,00	1,40	12	0,54	0,45	0,22	*	0,30	19,6	80,4	15,7	3,9
	13-2666	T07-18	14,90	15,00	4,29	74,00	3,17	14,00	0,60	11	0,47	0,3	0,0179	*	*	22,1	77,9	18,6	3,5

	13-3112	T13-2918	10,60	30,00	3,65	72,30	2,64	18,90	0,69	3	0,11	1	0,0474	*	*	*	*	*	*
	13-3142	T05-509	7,10	29,00	4,61	62,00	2,86	13,00	0,60	19	0,88	2,19	0,0646	*	*	29,9	70,1	26,8	3,1
	13-327?	T13-3087	12,40	173,00	13,39	67,00	8,97	19,00	2,54	9	1,21	3,36	0,1673	*	2,70	30,8	69,2	23,3	7,5
	13-3895	T13-3618	17,10	250,00	9,25	66,00	6,11	21,00	1,94	4	0,37	0,5	0,0342	*	*	11,7	88,3	8,8	2,9
	13-5156	T13-5102	13,90	22,00	5,36	79,00	4,23	9,00	0,48	12	0,64	0,27	0,016	*	*	6,5	93,5	3,9	2,6
	13-5301	T13-5219	13,70	23,00	4,42	74,00	3,27	12,00	0,53	14	0,62	0,25	0,0139	*	*	8,6	91,4	4,3	4,3
	13-5473	T12-6284	12,50	24,00	4,63	74,00	3,43	12,00	0,56	14	0,65	0,67	0,0344	0,70	?	19,7	80,3	16,5	3,2
	13-6025	T13-6015	15,80	114,00	6,39	64,00	4,09	25,00	1,60	8	0,51	0,88	0,0562	*	*	12,2	87,8	11	1,2
2014	14-271	T14-317	8,30	2,00	4,04	48,00	1,94	40,00	1,62	11	0,44	0,47	0,016	*	*	12,9	87,1	9,1	3,8
	14-742	T14-734	7,50	16,00	4,18	46,10	1,93	25,40	1,06	11	0,46	1,3	0,0422	*	*	*	*	*	*

Noir : Sysmex

Rouge : Procyte

Hémogrammes chiens : nuages anormaux (Sysmex + Procyte)				
		n°Hg	n° dossier	Nb hémogrammes
2008	Mars	08-1874	T08-1397	111
	Avril	08-2023	T07-3451	110
	Mai	08-3086	T08-1980	104
	Juin	08-3542	T04-1387	128
	Juillet	08-3976	T04-12	58
	Septembre			77
	Octobre			153
	Novembre			105
	Décembre	08-5616	T07-3556	97
2009	Janvier	09-295	T09-260	104
	Février	09-927	T09-782	94
	Mars	09-1173	T09-1068	127
	Avril	*	*	96
	Mai	*	*	106
	Juin	*	*	114
	Juillet	09-3481	T09-3259	76
	Septembre	09-4089	T01-1174	113
2010	Février	10-1022	T10-864	115
	Mars	*	*	125
	Avril	*	*	94
	Mai	*	*	109
	Juin	10-3472	T08-4711	
		10-3463	T10-3059	110
	Juillet	*	*	67
	Septembre	*	*	91
	Octobre	10-4992	T10-4744	134
	Novembre	*	*	97
	Décembre	*	*	61
2011	Janvier	11-434	T01-11004	
		11-445	T11-374	154
	Février	*	*	98
	Mars	*	*	151
	Avril	*	*	170
	Mai	*	*	152
	Juin	*	*	120
	Juillet	*	*	85
	Septembre	*	*	113
	Octobre	11-4861	T09-2261	110
	Novembre	*	*	121
	Décembre	11-5804	T11-6311	70
2012	Janvier	12-137	T12-129	114
	Février	*	*	107
	Mars	*	*	125

	Avril	*	*	127
	Mai	*	*	111
	Juin	12-3126	T12-2672	127
	Juillet	*	*	66
	Septembre	12-4251	T12-5063	100
	Octobre	12-4424	T02-3625	121
	Novembre	12-5258	T07-2734	135
	Décembre	*	*	75
2013	Janvier	*	*	106
	Février	*	T12-5884	104
	Mars	13-1551	T11-5518	122
	Avril	13-2262	T13-2053	
		13-2190	T13-2005	121
	Mai	13-3112	T13-2918	
		13-3142	T05-509	136
	Juin	*	*	114
	Juillet	*	*	78
	Septembre	*	*	109
	Octobre	13-5473	T12-6284	113
	Novembre	*	*	114
	Décembre	*	*	84
2014	Janvier	*	*	80
	Février	14-1146	T14-1116	98
			T14-859	
	Mars	*	*	120
	Avril	14-2368	T14-2262	
		14-2042	T14-1961	118
	Mai	*	*	35

Toulouse, 2015

NOM : GIRAUD **PRENOM** : Léna

TITRE : NUAGES DE POINTS ANORMAUX DANS LA REGION DES RETICULOCYTES OBTENUS PAR CYTOMETRIE EN FLUX CHEZ DES CHIENS ATTEINTS DE BABESIOSE : ETUDE RETROSPECTIVE DE 92 CAS.

Resumé : La babésiose ou piroplasmose canine est une maladie vectorielle transmise par les tiques présente dans le monde entier ; par conséquent, les vétérinaires praticiens y sont souvent confrontés. Cette parasitose, due à un protozoaire intra-érythrocytaire du genre *Babesia*, est responsable d'un tableau clinique polymorphe et peut engager le pronostic vital de l'animal, d'où l'importance de réaliser un diagnostic précoce. Le but de cette étude est : de déterminer si les chiens atteints de babésiose présentent un profil réticulocytaire anormal ; de l'identifier le cas échéant ; enfin corréler ces résultats au diagnostic primaire. Tous les hémogrammes canins réalisés avec le Sysmex XT-2000iV ou le Procyte DX ont été revus. Les cas de babésiose ont été identifiés et les profils réticulocytaires analysés. Ensuite, les chiens présentant un profil réticulocytaire anormal sans être atteints de babésiose ont été identifiés, et les nuages de points ainsi que les indices de fluorescence ont été comparés avec ceux des chiens atteints de babésiose. Parmi 92 chiens atteints de babésiose, 20 présentaient un profil anormal des réticulocytes et chez 8 d'entre eux cette anomalie était caractérisée par une séparation complète entre le nuage des réticulocytes et celui des hématies, ou par une continuité entre les nuages mais une densité de points plus importante au milieu de la 'queue de comète' qu'au début. Chez les 6980 chiens indemnes de babésiose, 13 présentaient un profil réticulocytaire anormal, parmi lesquels 3 chiens atteints de leucémie avec blastes circulants. Les chiens atteints de babésiose avec des nuages de points anormaux tendaient à avoir un MFR plus élevé que les autres chiens ; en revanche chez un chien atteint de leucémie le HFR était plus élevé. Des nuages de points anormaux et des indices de fluorescence atypiques peuvent constituer un signal d'appel alertant les cliniciens lors du diagnostic de piroplasmose.

MOTS-CLES : *BABESIA*, NUAGES DE POINTS, PSEUDORETICULOCYTOSE, INDICE DE FLUORESCENCE DES RETICULOCYTES

TITLE : SPURIOUS RETICULOCYTE DOT PLOTS IN DOGS WITH BABESIOSIS : A RETROSPECTIVE STUDY OF 92 CASES.

Abstract: Babesiosis is a tick borne disease affecting dogs worldwide, that's why vets around the world are often confronted with it. This disease, due to an intra-erythrocytic parasite of the genus *Babesia*, is responsible for polymorphous clinical signs and can lead to a life-threatening condition for patients. That's why early diagnosis of this affection is capital. Pseudoreticulocytosis and an abnormal reticulocyte profile were observed in a dog with babesiosis presented to our institution. The aims of this study were: to determine if dogs with babesiosis had abnormal reticulocyte profiles; to identify abnormal reticulocyte profiles in other dogs; to correlate the profiles with the primary diagnosis. All canine CBCs performed with the Sysmex XT-2000iV or Procyte DX hematology analyzers were reviewed. Cases of babesiosis were selected and reticulocyte profiles were analyzed. Then, dogs with abnormal reticulocyte profiles but without babesiosis were identified, and reticulocyte profiles and reticulocyte fluorescence ratios were compared with those of dogs with babesiosis. Of 92 dogs with babesiosis, 20 had abnormal reticulocyte dot plot profiles with 8 characterized by a complete separation between the reticulocyte and the mature RBC plots or a continuum of reticulocytes from the RBC plot but with a higher density of dots in the middle part of the "tail of the comet" than at the beginning. Of 6980 dogs without babesiosis, 13 had abnormal reticulocyte dot plot profiles; 3 of these dogs had leukemia with circulating blast cells. Dogs with babesiosis and abnormal plots tended to have reticulocytes with higher medium-fluorescence ratios than other dogs, whereas in one dog with leukemia the high-fluorescence ratio was higher. Abnormal reticulocyte dot plots and atypical reticulocyte fluorescence ratios may occur in dogs with babesiosis and alert clinical pathologists and clinicians to consider this diagnosis.

KEY WORDS: *BABESIA*, DOT PLOTS, PSEUDORETICULOCYTOSIS, RETICULOCYTE FLUORESCENCE RATIOS.