

Année 2008

**Intérêt de l'amplification génique (PCR) pour diagnostiquer
les piroplasmoses canines en France**

THESE

Pour le

DOCTORAT VETERINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

Le

par

Elodie, Lysiane, Eliane VISEE

Née le 6 décembre 1983 à Valenciennes (Nord)

JURY

Président : M.

Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL

Membres

Directeur : M. Jacques GUILLOT

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

Assesseur : M. Henri Jean BOULOUIS

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur COTARD Jean-Pierre

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard

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

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur - Adjoint : M. DEGUEURCE Christophe, Professeur

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

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

Chef du département : M. FAYOLLE Pascal, Professeur - Adjoint : M. POUCHOLON Jean-Louis , Professeur

- UNITE DE MEDECINE M. POUCHOLON Jean-Louis, Professeur* Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. BLOT Stéphane, Maître de conférences M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences Mme MAUREY Christelle, Maître de conférences contractuel - UNITE DE CLINIQUE EQUINE M. DENOIX Jean-Marie, Professeur M. AUDIGIE Fabrice, Maître de conférences* Mme GIRAUDET Aude, Professeur contractuel Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel M. PICCOT-CREZOLLET Cyrille, Maître de conférences contractuel -UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Maître de conférences* (rattachée au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP) M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Melle CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP) Melle LEDOUX Dorothée, Maître de conférences Contractuel (rattachée au DPASP)	- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE M. FAYOLLE Pascal, Professeur * M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. MOISSONNIER Pierre, Professeur Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences Mlle RAVARY Bérangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences contractuel M. HIDALGO Antoine, Maître de conférences contractuel - UNITE DE RADIOLOGIE Mme BEGON Dominique, Professeur* Mme STAMBOULI Fouzia, Maître de conférences contractuel -UNITE D'OPHTALMOLOGIE M. CLERC Bernard, Professeur* Melle CHAHORY Sabine, Maître de conférences contractuel - UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES M. CHERMETTE René, Professeur M. POLACK Bruno, Maître de conférences* M. GUILLOT Jacques, Professeur Mme MARGNAC Geneviève, Maître de conférences contractuel -UNITE DE NUTRITION-ALIMENTATION M. PARAGON Bernard, Professeur * M. GRANDJEAN Dominique, Professeur
--	--

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

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

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

Mme CALAGUE, Professeur d'Education Physique

* Responsable de l'Unité

AERC : Assistant d'Enseignement et de Recherche Contractuel

Remerciements au jury

A Monsieur le Professeur de la Faculté de médecine de Créteil,
Qui m'a fait l'honneur de présider mon jury de thèse
Hommage respectueux.

A Monsieur le Professeur Guillot,
Qui m'a fait l'honneur de diriger cette thèse
Sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Boulouis,
Pour sa relecture attentive
Sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Fritz,
Pour m'avoir transmis les résultats de ses analyses et pour son accueil.
Sincères remerciements.

A toute l'équipe du C.A.L.
Pour m'avoir montré et expliqué les manipulations pour réaliser et interpréter les PCR
et pour leur gentillesse
Sincères remerciements.

Remerciements personnels

A ma famille

A mes parents qui ont toujours été là, m'ont toujours soutenue et m'ont permis d'être qui je suis, merci de tout mon cœur.

A ma sœur Marion et sa joie de vivre et à mon frère Victor et sa gentillesse.

A ma grand mère maternelle, que tu vives encore très longtemps et à mon grand père maternel parti trop tôt.

A mes grands parents paternels que j'ai si peu connus.

A mes oncles, tantes et cousins et cousines...

A Volta, mon cocker qui est à mes côtés pour le meilleur comme pour le pire avec toujours la même tendresse dans le regard.

A mes amis

A Cécile et nos nombreuses heures passées à boire des cafés...

Au groupe 9 (Cécile, Clara, Eve, Emilie, Lucie, Lucille, Julie, Tiphaine et Bouli) pour ces merveilleuses heures passées ensemble en clinique, en TD et en soirée.

A mes deux Co T1 Glagla et Bep, pour cette super année que nous avons passée ensemble.

A mon père de clinique, merci pour ta formation.

A la clinique vétérinaire Saint Antoine, qui m'a appris tant de choses.

A mon ancien et à mon poulot ...

Intérêt de l'amplification génique (PCR) pour diagnostiquer les piroplasmoses canines en France

NOM et Prénom : VISEE Elodie

Résumé

La piroplasmose canine est due à la multiplication de protozoaires du genre *Babesia* (et plus rarement *Theileria*) dans les érythrocytes. Les parasites sont transmis aux chiens par des tiques de la famille des Ixodidés. L'amplification génique (PCR) est maintenant proposée pour le diagnostic de la maladie et l'identification des piroplasmes.

Lors de ce travail de thèse, les données accompagnant 75 cas de PCR positives réalisées par le laboratoire C.A.L (Companion Animal Laboratory de Troyes) entre le 15 mars 2006 et le 4 janvier 2008 ont été analysées. Cette étude a révélé une prédominance de *Babesia canis canis* (84%) mais aussi la présence de *Theileria* spp. pour certains prélèvements (12%). La répartition annuelle du nombre de PCR identifiant *Babesia canis canis* correspond à la période d'activité de la tique *Dermacentor reticulatus*. Les PCR mettant en évidence *Theileria* spp. semblent plus nombreuses l'hiver, ce qui laisse penser qu'un vecteur différent transmet ces piroplasmes. Les départements ayant eu le plus de PCR positives pour *Babesia canis canis*, sont ceux pour lesquels la prévalence de la maladie est élevée. Trois foyers de *Theileria* semblent identifiés par cette étude. La thrombocytopénie est la modification hématologique la plus fréquemment observée pour les deux genres de parasite (80% des cas), vient ensuite l'anémie (70% des cas) et la neutrophilie (60% des cas). L'étude de 5 cas présentant un tableau clinique atypique de piroplasmose souligne l'intérêt de la PCR pour le clinicien afin de détecter et de suivre cette parasitose.

Mots clés : PROTOZOOSE – *BABESIA* – *THEILERIA* – PIROPLASMOSE – TECHNIQUE DIAGNOSTIQUE – AMPLIFICATION GÉNIQUE (PCR) – CARNIVORE – CHIEN – FRANCE

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Pr. Jacques GUILLOT

Assesseur : Pr. Henri Jean BOULOUIS

Adresse de l'auteur :

Melle Elodie VISEE

29ter rue des blancs rieux

59195 HERIN

Usefulness of Polymerase Chain reaction (PCR) to diagnose canine piroplasmosis

SURNAME and Given name : VISEE Elodie

Summary

Canine piroplasmosis is caused by multiplication of protozoa of the genera *Babesia* or *Theileria*. Hard ticks are vectors for these parasites. Polymerase Chain reaction (PCR) is now offered for the diagnosis of canine and equine piroplasmosis and for piroplasms identification.

For this thesis, medical reports of 75 dogs with positive PCR (performed by Companion Animal Laboratory in Troyes) from 15th March 2006 to 4th January 2008 have been analysed. This study revealed predominance of *Babesia canis canis* (84%) along with *Theileria* spp. in some samples (12%). The annual repartition of PCR identifying *Babesia canis canis* corresponds to the activity period of the tick *Dermacentor reticulatus*. PCR tests identifying *Theileria* are more numerous in winter, which leads us to think that another vector occurs for these piroplasms. The areas (French departments) with many positive PCR (for *Babesia canis canis*), are those where prevalence of the disease is highest. Three focus of *Theileria* spp. Infection have been identified in this study. The most common disorder in *Babesia canis canis* and *Theileria* spp. affecting dogs is thrombocytopenia (80%), followed by anaemia (70%) and neutrophilia (60%).

The study of 5 cases with atypical signs of piroplasmosis demonstrated the usefulness of PCR for the clinician to detect and follow canine piroplasmosis.

Keywords : PROTOZOOSIS – *BABESIA* – *THEILERIA* – PIROPLASMOSIS – DIAGNOSTIC TECHNIQUE – GENIQUE AMPLIFICATION (PCR) – CARNIVORE – DOG – FRANCE

Jury :

President : Pr.

Director : Pr. Guillot Jacques

Assessor : Pr. Boulouis Henri Jean

Author's address:

Melle Elodie VISEE

29ter rue des blancs rieux

59195 HERIN

Table des matières

Remerciements au jury.....	3
Remerciements personnels	4
Table des matières.....	1
Liste des figures.....	9
Liste des tableaux.....	11
Introduction.....	13
Partie 1: Piroplasmes parasites du chien.....	15
I.Classification des piroplasmes.....	17
I.1.Taxinomie.....	17
.I.1.1. Les Babésiidés	19
.I.1.2.Les Theilériidés	19
I.2. Classification des piroplasmes au sein des genres Theileria et Babesia.....	20
.I.2.1. Classification en fonction de la morphologie.....	20
.I.2.2.Classification en fonction de l'hôte, du vecteur et de la répartition géographique	22
.I.2.3.Classification phylogénétique.....	25
II.Épidémiologie des piroplasmoses et cycles évolutifs des piroplasmes	35
II.1. Epidémiologie.....	35
.II.1.1. Sources des parasites.....	35
.II.1.2. Présentation des vecteurs.....	35
.II.1.3.Prévalence des piroplasmoses canines en France.....	38
.II.1.4.Facteurs favorisant la transmission des piroplasmoses canines.....	40
II.2.Cycle évolutif des parasites du genre Babesia.....	41
.II.2.1.Développement chez le chien.....	42
.II.2.2. Développement chez la tique.....	45
II.3.Particularités du cycle des parasites du genre Theileria.....	47
.II.3.1.Développement chez le chien.....	48
.II.3.2.Développement chez la tique	49
III. Pathogénie.....	50

III.1.Phénomènes fondamentaux.....	50
.III.1.1.Hémolyse intra-vasculaire.....	50
.III.1.2.Adhérence des hématies.....	50
.III.1.3.Production de complexes immuns.....	51
.III.1.4.Thrombose.....	51
.III.1.5.Choc.....	52
.III.1.6.Hémolyse extra-vasculaire.....	52
III.2.Particularités pathogéniques des différents piroplasmes.....	54
.III.2.1.Pathogénie où dominant des phénomènes de chocs, thrombose et agglutination des hématies dans les capillaires.....	54
.III.2.2.Pathogénie où domine l'hémolyse.....	56
III.3.Pronostic.....	57
III.4.Méthodes de lutte.....	58
.III.4.1.Traitement.....	58
.III.4.2.Rechute.....	60
.III.4.3.Prophylaxie.....	61
Partie 2 : Diagnostic des piroplasmoses canines	65
IV.Diagnostic épidémiologique.....	67
IV.1.Anamnèse	67
IV.2.Données épidémiologiques.....	67
V.Examen clinique : recherche de signes cliniques de piroplasmose.....	68
V.1.État général de l'animal.....	68
V.2.Température corporelle.....	68
V.3.Examen des muqueuses oculaires, vulvaires, buccales	69
V.4.Palpation abdominale	69
V.5.Examen des urines.....	69
V.6.Autres signes cliniques	69
.V.6.1.Troubles digestifs.....	69
.V.6.2.Troubles cutanés.....	70
.V.6.3.Troubles cardio-pulmonaires	70
.V.6.4.Troubles nerveux et locomoteurs	70
.V.6.5.Troubles hémorragiques.....	70
.V.6.6.Conclusion de l'examen clinique.....	70

VI.Examens biochimiques : recherche de complications.....	71
VI.1.Complications rénales.....	71
.VI.1.1.Bandelette urinaire.....	71
.VI.1.2.Dosage de l'urémie et de la créatininémie sanguine.....	71
.VI.1.3.Dosage de la protéine C réactive.....	72
VI.2.Complications hépatiques.....	72
VII.Examens hématologiques.....	73
VII.1.Numération formule.....	73
.VII.1.1.Erythrocytes.....	73
.VII.1.2.Plaquettes.....	73
.VII.1.3.Leucocytes.....	73
VII.2.Examen direct du parasite.....	74
.VII.2.1.Réalisation du frottis sanguin.....	74
.VII.2.2.Interprétation du frottis.....	75
.VII.2.3.Intérêts et limites de l'examen direct.....	76
VIII.Examens immunologiques	79
VIII.1.Immunité lors de babésiose.....	79
.VIII.1.1.Immunité à médiation humorale.....	79
.VIII.1.2.Immunité à médiation cellulaire.....	80
VIII.2.Immunofluorescence indirecte (I.F.I).....	80
.VIII.2.1.Principe.....	80
.VIII.2.2.Réalisation.....	81
.VIII.2.3.Interprétation.....	81
.VIII.2.4.Valeur de la technique.....	82
VIII.3.ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)	83
.VIII.3.1.Principe.....	83
.VIII.3.2.Réalisation.....	83
.VIII.3.3.Interprétation.....	83
.VIII.3.4.Valeur de la technique.....	84
VIII.4.Conclusion générale sur les méthodes immunologiques.....	84
.VIII.4.1.Avantages	84
.VIII.4.2.Inconvénients	84
IX. Amplification génétique	86

IX.1.Principe général de la PCR.....	86
IX.2.Matériel	86
IX.3.Amorces.....	87
IX.4.Nombre de cycles.....	87
IX.5.Enzymes.....	87
IX.6.Tampon réactionnel.....	87
IX.7.Technique.....	87
.IX.7.1.Extraction de l'ADN.....	87
.IX.7.2.Dénaturation	88
.IX.7.3.Hybridation	88
.IX.7.4.Elongation	88
IX.8.Différents types de PCR.....	90
.IX.8.1.PCR classique.....	90
.IX.8.2.PCR nichée.....	90
.IX.8.3.PCR en temps réel.....	91
.IX.8.4.Technique LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification).....	92
IX.9.Identification des produits d'amplification.....	95
.IX.9.1.Electrophorèse des produits obtenus.....	95
.IX.9.2.Analyse de profil de restriction (RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism).....	95
IX.10.Séquençage direct.....	97
X.Conclusion	100
Partie 3 : Travaux réalisés à partir des données recueillies par le laboratoire C.A.L à Troyes	102
XI.Technique utilisée	104
XI.1.Lyse des hématies.....	104
XI.2.Extraction de l'ADN.....	104
XI.3.Amplification de l'ADN.....	105
XI.4.Migration	106
XI.5.Lecture du gel.....	107
XI.6.Profils de restriction.....	108
XI.7.Critique de la technique employée.....	110
XII.Analyse des données obtenues à partir des PCR positives.....	111

XII.1.Age des animaux atteints	111
XII.2.Sexe des animaux atteints.....	112
XII.3.Répartition des PCR positives sur l'année.....	113
XII.4.Origine géographique.....	114
.XII.4.1.Répartition géographique de toutes les PCR	114
.XII.4.2.Répartition des cas de Theileria.....	116
XII.5.Type de piroplasme	117
XII.6.Charge parasitaire.....	118
XII.7.Co-infection.....	119
XII.8.Changement hématologique.....	120
.XII.8.1.Évaluation des paramètres érythrocytaires.....	122
.XII.8.2.Évaluation du nombre de plaquettes.....	123
.XII.8.3.Evaluation du nombre de leucocytes et de la formule leucocytaire.....	124
XII.9.Frottis sanguin.....	126
XII.10.Conclusion de l'étude	128
XIII.Intérêt de la PCR pour quelques cas cliniques.....	129
XIII.1.Cas clinique numéro 1 : bichon femelle non stérilisée née en 2001.....	129
.XIII.1.1.Anamnèse.....	129
.XIII.1.2.Motif de consultation.....	130
.XIII.1.3.Examen clinique.....	130
.XIII.1.4.Examens complémentaires.....	130
.XIII.1.5.Traitement	131
.XIII.1.6.Evolution clinique.....	131
.XIII.1.7.Discussion.....	132
XIII.2.Cas clinique numéro 2 : cavalier king charles mâle, non castré, né en 2002	132
.XIII.2.1.Motif de consultation.....	132
.XIII.2.2.Anamnèse.....	132
.XIII.2.3.Examen clinique.....	132
.XIII.2.4.Examens complémentaires.....	133
.XIII.2.5.Traitement	133
.XIII.2.6.Evolution clinique.....	134
.XIII.2.7.Discussion.....	134
XIII.3.Cas clinique numéro 3 : westie mâle non castré, né en 2002.....	135

.XIII.3.1.Anamnèse.....	135
.XIII.3.2.Motif de consultation.....	135
.XIII.3.3.Examen clinique.....	135
.XIII.3.4.Examens complémentaires.....	135
.XIII.3.5.Traitement.....	136
.XIII.3.6.Evolution clinique.....	136
.XIII.3.7.Discussion.....	137
XIII.4.Cas clinique numéro 4 : chienne schnauzer, stérilisée, née en 1997.....	138
.XIII.4.1.Anamnèse	138
.XIII.4.2.Motif de consultation.....	138
.XIII.4.3.Examen clinique.....	138
.XIII.4.4.Examens complémentaires.....	138
.XIII.4.5.Traitement.....	139
.XIII.4.6.Evolution clinique.....	139
.XIII.4.7.Discussion.....	139
XIII.5.Cas clinique numéro 5 : chienne croisée non stérilisée, née en 2001.....	140
.XIII.5.1.Anamnèse.....	140
.XIII.5.2.Motif de consultation.....	140
.XIII.5.3.Examen clinique.....	140
.XIII.5.4.Examens complémentaires.....	140
.XIII.5.5.Traitement	141
.XIII.5.6. Evolution clinique.....	141
.XIII.5.7.Discussion.....	142
XIII.6.Conclusion.....	142
Conclusion générale.....	144
Bibliographie.....	146
Annexes.....	156
Annexe 1: données issues des dossiers d'animaux ayant eu une PCR positives par CAL	158
Annexe 2 : Tableau récapitulatif des analyses sanguines du cas clinique numéro 1.....	160
Annexe 3 : Tableau récapitulatif des analyses sanguines du cas clinique numéro 2.....	161
XIV. Annexe 4 : Numération formule et PCR du cas clinique numéro 3.....	163
Annexe 5 : Numération formule du cas clinique numéro 4.....	165

Annexe 6 : PCR du cas clinique numéro 5.....	166
--	-----

Liste des figures

Figure 1 : Taxinomie des piroplasmes.....	18
Figure 2 : Hématies parasitées par <i>Babesia canis</i> (d'après Boozer et Macintire, 2003).....	21
Figure 3 : Hématies parasitées par <i>Babesia gibsoni</i> (d'après Boozer et Macintire, 2003).....	21
Figure 4 : Forme intra érythrocytaire de <i>Theileria annae</i> (au grossissement X1000) (d'après Garcia, 2006).....	22
Figure 5 : Arbre phylogénique classant les espèces de <i>Babesia</i> et celles de <i>Theileria</i> selon les séquences du gène codant pour l'ARNr 18S (d'après Birkenheuer et al., 2004).	27
Figure 6 : Arbre phylogénétique classant les espèces et sous espèces de <i>Babesia</i> selon la similitude de leur séquence ITS2 (d'après Kjemtrup et al., 2006). Les piroplasmes parasitaires du chien sont soulignés.....	29
Figure 7 : Arbre phylogénétique classant les espèces et sous espèces de <i>Babesia</i> et de <i>Theileria</i> selon la similitude de leur l'ARN codant pour l'HSP70 (d'après Yamasaki, 2007). Les piroplasmes parasitaires du chien sont soulignés.....	32
Figure 8 : Arbre phylogénétique classant les espèces et sous espèces de <i>Babesia</i> et de <i>Theileria</i> selon la similitude de leur protéine l'HSP70 (d'après Yamasaki, 2007). Les piroplasmes parasitaires du chien sont soulignés.....	33
Figure 9 : Nombre de cas de piroplasmoses canines par cabinet et par an (d'après Bourdoiseau et Renard, 2005).....	39
Figure 10 : Cycle évolutif de <i>Babesia canis</i> (d'après Bussiéras et Chermette, 1992).....	41
Figure 11 : Représentation schématique de l'invasion d'un érythrocyte par <i>B. bovis</i> (d'après Yokoyama et al., 2006)	44
Figure 12 : Forme bigéminée de <i>Babesia canis</i> (d'après Bussiéras et Chermettte, 1992).....	45
Figure 13 : Cycle évolutif de <i>Theileria annulata</i> (d'après Bussiéras et Chermette, 1992).....	47
Figure 14 : Phénomènes fondamentaux de pathogénie des piroplasmoses (d'après Pagès et Trouillet, 1984).....	53
Figure 15 : Déroulement d'un cycle de PCR.....	89
Figure 16 : Technique LAMP (d'après David et Turlotte, 1998)	93
Figure 17 : Profil de digestion (d'après Jefferies et al., 2007).....	96
Figure 18 : Profil de migration des échantillons testés.....	107

Figure 19 : Profil de migration de la première digestion	109
Figure 20 : Profil de migration de la seconde digestion	109
Figure 21 : Age des animaux atteints de piroplasmose	112
Figure 22 : Nombre de PCR par mois (données cumulées de mars 2006 à janvier 2008)	113
Figure 23 : Carte A : prévalence de la piroplasmose en France, Carte B : répartition des PCR positives par département	114
Figure 24 : Répartition des cas de Theileria	116
Figure 25 : Répartition des piroplasmes identifiés par les PCR-PRFLP au laboratoire C.A.L.	117
Figure 26 : Charge parasitaire des animaux malades	118
Figure 27 : Répartition de la charge parasitaire des animaux en fonction du piroplasme.....	119
Figure 28 : Répartition de la thrombocytopénie	124

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des piroplasmes infectant le chien	25
Tableau 2 : Profil de digestion (d'après Jefferies et al., 2007).....	96
Tableau 3 : Caractéristiques des différentes techniques diagnostiques	98
Tableau 4 : Etapes de la technique PCR utilisée par le laboratoire C.A.L	106
Tableau 5 : Numération formule des 33 chiens.....	121
Tableau 6 : Formule leucocytaire.....	125
Tableau 7 : Valeur de la numération formule suivant la présence ou non de piroplasme sur le frottis	127

Introduction

La piroplasmose canine est une maladie parasitaire, infectieuse, inoculable et non contagieuse due au développement et à la multiplication dans les hématies, de protozoaires du genre *Babesia* et *Theileria*. Les parasites sont transmis aux chiens par des tiques de la famille des *Ixodidés* (tiques dures).

Elle se traduit classiquement par un syndrome fébrile et hémolytique associé à une hémoglobinurie. Il n'existe pas de signe pathognomonique et d'autres manifestations cliniques, parfois déroutantes pour le praticien, sont fréquentes. Les nombreuses recherches conduites sur cette maladie ont cependant doté le praticien de méthodes de diagnostic dépassant le simple examen clinique. Ce sont notamment la recherche directe de parasite soit par microscopie sur un étalement sanguin coloré soit par PCR, ou la recherche indirecte par la mise en évidence d'anticorps spécifiques dirigés contre le parasite.

Dans le cadre d'une recherche des parasites, il est indispensable de bien connaître les données concernant la classification des piroplasmes, leur épidémiologie, leur cycle évolutif ainsi que leur pathogénie. Nous y consacrerons donc une première partie.

Dans une deuxième partie, nous passerons en revue les principaux moyens de diagnostic dont le praticien dispose. Ce sont les diagnostics épidémiologique, clinique, hématologique, sérologique et enfin moléculaire.

Dans une dernière partie, nous détaillerons précisément la technique de détection moléculaire utilisée au Companion Animal Laboratory (C.A.L.) de Troyes, discuterons des résultats obtenus sur un échantillon de chiens et enfin nous illustrerons l'intérêt de la PCR pour le vétérinaire praticien par quelques cas cliniques.

Partie 1: Piroplasmes parasites du chien

I. Classification des piroplasmes

I.1. Taxinomie

Les piroplasmes, par leur noyau de type eucaryote et par le fait qu'ils sont unicellulaires, appartiennent **au règne des Protistes** (Bussiéras et Chermette, 1992).

Ils sont souvent mobiles, possèdent une paroi non cellulosique et ont un développement hétérotrophe, ce qui les rattache **au sous règne des protozoaires**.

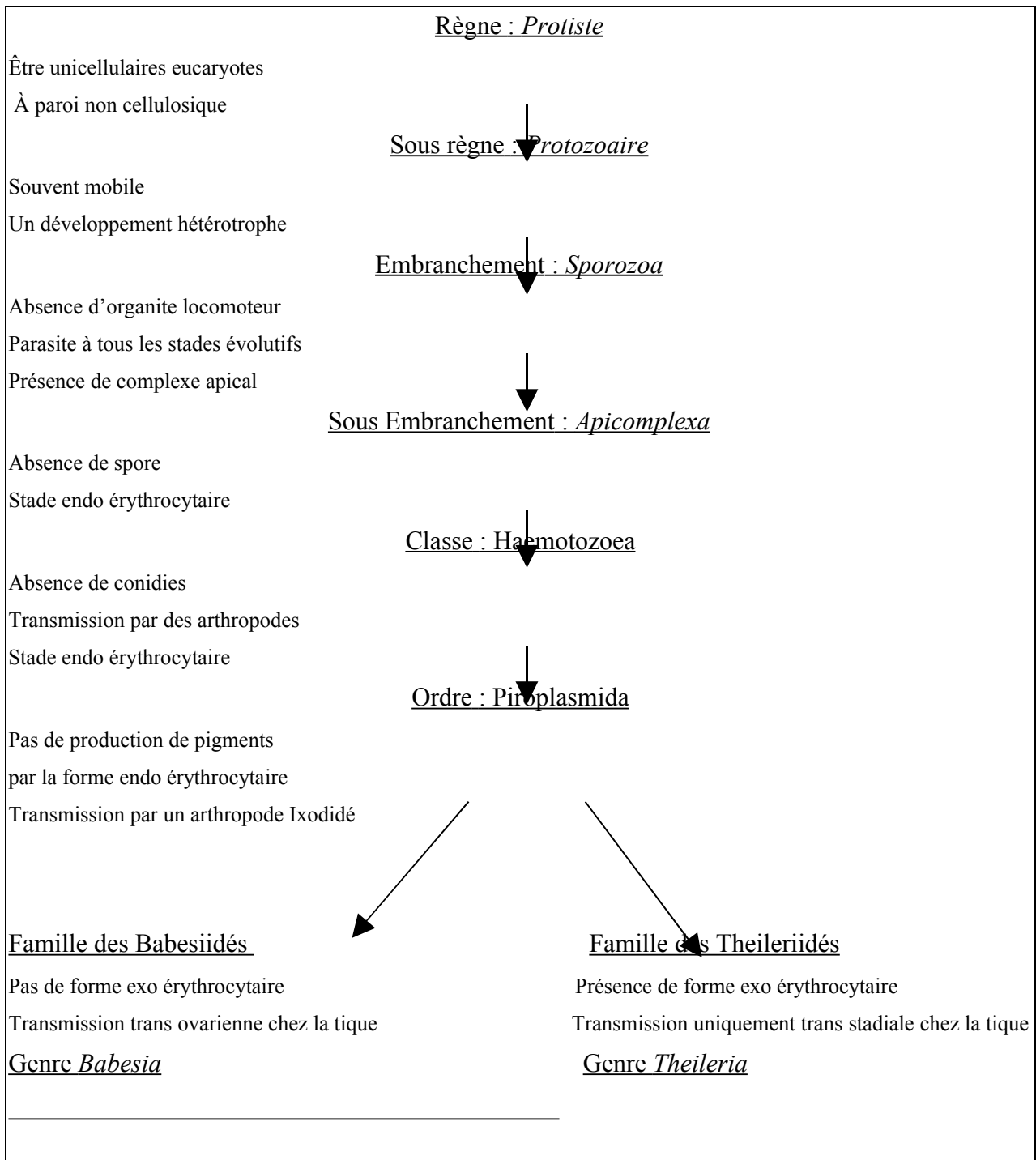
Il existe 7 embranchements de protistes. Les piroplasmes appartiennent à **l'embranchement des *Sporozoa*** et au sous embranchement des ***Apicomplexa***, car ils sont totalement dépourvus d'organites locomoteurs et qu'à certains stades de leur vie, ils possèdent un complexe apical visible en microscopie électronique.

L'absence de spores (car le complexe apical est dépourvu de cono ide), le stade endo-érythrocytaire, ainsi que la transmission grâce à des arthropodes hématophages chez lesquels il se forme un ookinète, sont des éléments caractéristiques de la **classe des *Haemotzoa*** (Bussiéras et Chermette, 1992).

Ils appartiennent à **l'ordre des Piroplasmida** (Euzéby, 1988), car leur forme endo-érythrocytaire ne produit pas de pigment et que leur transmission se fait par des acariens Ixodidés.

Les piroplasmes se divisent ensuite en deux familles : **les *Babesiid s* et les *Theileriid s***. Cette classification repose sur la présence ou l'absence de forme exo-érythrocytaire (Figure 1).

Figure 1 : Taxinomie des piroplasmes



.I.1.1. Les Babésiidés

Chez l'hôte vertébré, ces piroplasmes ne possèdent pas de forme exo-érythrocytaire et sont transmises de façon trans-ovarienne chez la tique.

Leur cycle hétéroxène comporte, chez l'hôte vertébré, une localisation exclusivement **endo-érythrocytaire** et une **reproduction asexuée** par bipartitions répétées. Cette reproduction aboutit à la formation de **gamontes**, chez la tique vecteur femelle. Chez celle-ci, il y a une fécondation dans l'intestin moyen et production de **kinètes** par le zygote, ceux-ci migrent vers diverses cellules y compris les ovocytes. Il se forme ensuite des **sporogonies** dans les cellules envahies par les kinètes. Lors du repas sanguin suivant, une nouvelle génération de protozoaires donne des sporozoïtes dans les glandes salivaires. Il n'y a qu'un seul genre au sein de cette famille : le **genre *Babesia***.

Ce genre contient de nombreuses espèces. Les principales espèces retrouvées chez les animaux domestiques sont : *B. canis*, *B. gibsoni*, *B. divergens*, *B. bovis*, *B. major*, *B. bigemina*, *B. ovis*, *B. motasi*, *B. trautmanni*, *B. perroncitoi*, *B. microti*, *B. caballi*. et *B. conradae*.

.I.1.2. Les Theilériidés

Ces piroplasmes possèdent des formes exo-érythrocytaires chez l'hôte et ont une transmission uniquement trans-stadiale chez la tique.

Ce sont des piroplasmes dont le cycle hétéroxène comporte chez l'hôte vertébré des **schizogonies** pré-érythrocytaires dans les cellules lymphoïdes et le passage de gamontes dans les hématies (précédés ou non de multiplication endo-érythrocytaires) et chez la tique vectrice, une fécondation dans l'intestin moyen par hétérogamie (le zygote produit un kinète qui après la mue de la tique migre dans les glandes salivaires) et une sporogonie dans les glandes salivaires produisant de très nombreux sporozoïtes infectants.

Il n'y a qu'un seul **genre qui est *Theileria***.

Ce genre contient les espèces : *T. annulata*, *T. parva*, *T. orientalis*, *T. mutans*, *T. velifera*, *T. hirci*, *T. ovis*, *T. equi* (*T. equi* a d'abord été classée dans les Babésiidés mais, la découverte de forme exo-érythrocytaires a conduit au reclassement de celle-ci parmi les

Theilériidés) *T. annae* qui ressemble à *B. microti*, et *T. felis*. Des formes exo-erythrocytaires de *B. microti* sont suspectées mais n'ont pas encore été démontrées ce qui risque le cas échéant de reclasser ce piroplasma dans le genre *Theileria* (Homer *et al.*, 2000).

I.2. Classification des piroplasmes au sein des genres *Theileria* et *Babesia*

Les genres *Theileria* et *Babesia* ne se développent pas de la même façon chez leurs hôtes, de plus les espèces et les sous-espèces n'ont pas la même virulence ; il est donc intéressant de pouvoir identifier le piroplasma responsable de l'infection.

Il existe de très nombreuses espèces et sous espèces de *Babesia* et de *Theileria*, cette classification ne se veut pas exhaustive, c'est pourquoi elle ne comporte que les espèces touchant les animaux domestiques et détaille de façon plus minutieuse les espèces affectant le chien.

I.2.1. Classification en fonction de la morphologie

La forme et la taille des parasites observés au microscope optique permettent d'établir une première classification : les piroplasmes appartenant au genre *Babesia* sont de plus grande taille (entre 1,5 et 5 μm) que ceux appartenant au genre *Theileria* (entre 1 et 1.5 μm) (Mc Manus et Bowles, 1996).

Il existe ensuite une classification au sein des *Babesia* qui se fait selon la taille ; il en existe deux types, celles de **grande taille**, de longueur est supérieure au rayon de l'hématie (3 à 5 μm) et celles de **petite taille** (1,5 à 2,5 μm), de longueur inférieure au rayon de l'hématie.

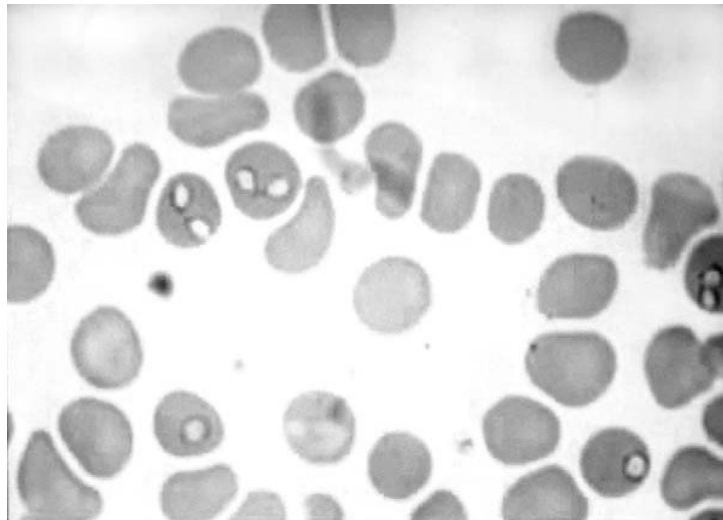
Parmi les babésies de grande taille, on compte : *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. motasi*, *B. caballi*, *B. canis*.

Pour les babésies de petite taille, on distingue : *B. divergens*, *B. gibsoni*, *B. microti*, *B. ovis*, *B. conradae* (pour les plus courantes).

Chez le chien, il est ainsi possible de faire la distinction entre *B. canis*, *B. gibsoni*, et *T. annae* en observant un frottis.

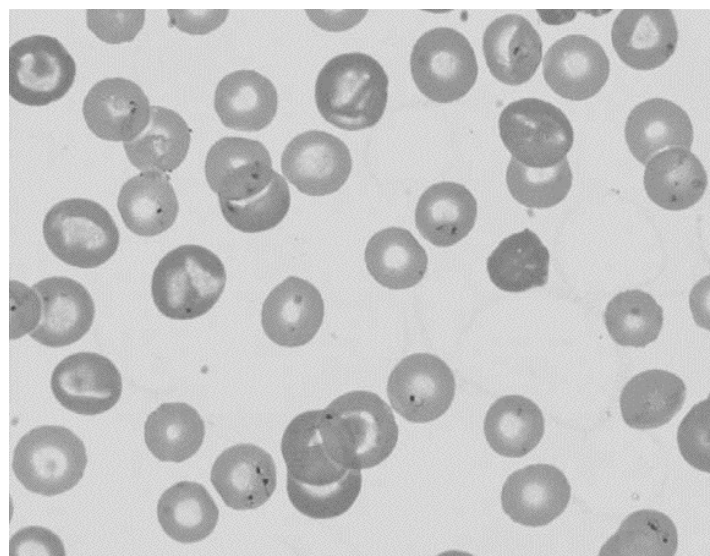
□ *B. canis* est une babésie de grande taille, elle est caractérisée par une forme annulaire qui mesure 2 à 4 µm et une forme en poire de 4 à 5 µm ; ces parasites sont souvent par paire sous cette forme (Figure 2). *B. canis* est subdivisée en trois sous-espèces indistinctes sur le plan morphologique : *B. canis canis*, *B. canis vogeli* et *B. canis rossi*.

Figure 2 : Hématies parasitées par *Babesia canis* (d'après Boozer et Macintire, 2003)



□ *B. gibsoni* peut avoir plusieurs formes ; une forme ovale le plus souvent, mais elle peut aussi avoir une forme en anneau (Figure 3). Elle est souvent trouvée seule dans l'hématie mais peut occasionnellement avoir une forme de tétrade.

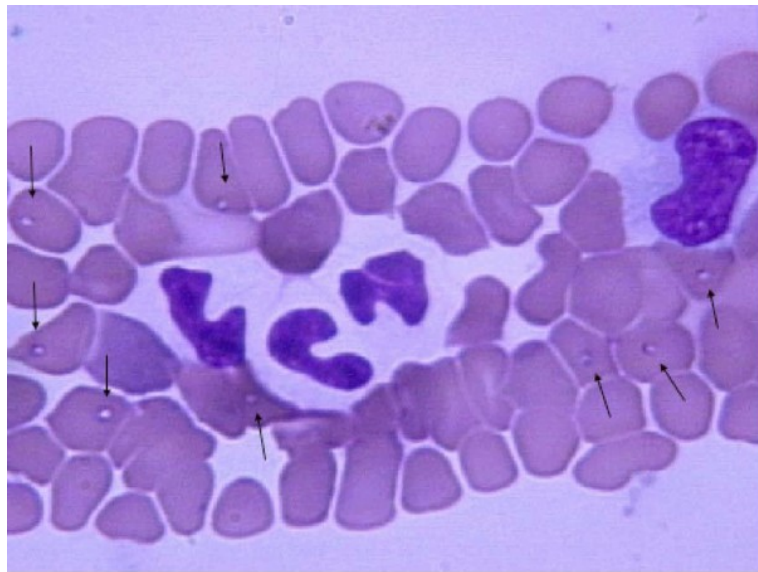
Figure 3 : Hématies parasitées par *Babesia gibsoni* (d'après Boozer et Macintire, 2003)



□ *B. conradae* et *B. microti* ne sont pas distinguables morphologiquement. Elles peuvent avoir une forme de tétrade dans l'hématie (Kjemtrup *et al.*, 2006).

□ *T. annae* ressemble fortement à *B. microti*, d'ailleurs l'autre nom donné à ce piroplasme est *B. microti-like*. Il n'existe pas de différence morphologique entre les espèces de *Theileria* (Figure 4).

Figure 4 : Forme intra érythrocytaire de *Theileria annae* (au grossissement X1000) (d'après Garcia, 2006)



I.2.2. Classification en fonction de l'hôte, du vecteur et de la répartition géographique

I.2.2.1. Classification en fonction de l'hôte

Chaque espèce de piroplasme est spécifique d'hôte.

- *B. canis* et *B. gibsoni*, *T. annae*, *B. conradae* sont des parasites spécifiques du **chien**
- *B. divergens*, *B. bovis*, *B. major*, *B. bigemina*, *T. annulata*, *T. parva*, *T. orientalis*, *T. mutans* et *T. velifera* sont des parasites spécifiques du **bœuf**
- *B. ovis* et *B. motasi*, *T. hirci* et *T. ovis* sont des parasites spécifiques des **petits ruminants**

- *B. trautmanni* et *B. perroncitoi* sont des parasites spécifiques du **porc**
- *B. caballi* et *T. equi* sont des parasites spécifiques du **cheval**
- *T. felis* est un parasite spécifique du **chat**

Il faut tout de même nuancer cette spécificité d'hôte. *B. equi* a été retrouvée chez plusieurs chiens dans 3 régions différentes d'Espagne, ces chiens ne présentaient que des symptômes discrets ce qui suggère un faible pouvoir pathogène chez cet hôte (Criado-Fornelio *et al.*, 2003). Ces mêmes auteurs ont isolé *B. canis canis* chez un cheval. Baneth *et al.* (2004), ont aussi identifié ce même piroplasma chez le chat (Baneth *et al.*, 2004).

I.2.2.2. Classification en fonction du vecteur

Les piroplasmes font tous intervenir dans leur cycle un acarien Ixodidé, chaque espèce de tique est susceptible de transmettre une ou plusieurs espèces de *Babesia* ou de *Theileria* :

- *Ixodes ricinus* est le vecteur de *B. divergens* et *B. microti*.,
- *Ixodes scapularis* (= *Ixodes daminii*) est le vecteur de *B. microti* dans l'Est de l'Amérique du Nord (Camacho *et al.*, 2003),
- *Ixodes hexagonus* semble être le vecteur le plus probable de *T. annae* dans le nord-ouest de l'Espagne (Camacho *et al.*, 2003),
- *Boophilus spp* est le vecteur de *B. bovis* et de *B. bigemina*.,
- *Haemaphysalis spp* est le vecteur de *B. major*, *B. canis rossi* et *B. gibsoni*.,
- *Rhipicephalus spp* est le vecteur de *B. ovis*, *B. motasi*, *B. trautmanni*, *B. perroncitoi*, *T. parva*, *T. ovis*, *T. equi* et *Rhipicephalus sanguineus* est le vecteur de *B. canis vogeli* et *B. gibsoni*,
- *Dermacentor spp* est le vecteur de *B. perroncitoi*, *T. felis* et *Dermacentor reticulatus* est le vecteur de *B. caballi* et *B. canis canis*.

I.2.2.3. Classification en fonction de la répartition géographique

Les conditions de vie des vecteurs influent sur la répartition géographique des espèces de piroplasmes.

Ainsi chez le chien, on trouvera ***B. gibsoni*** en Asie, Amérique du Nord, au sud et à l'est de l'Afrique et plus rarement en Europe du Sud, le sous type asiatique a été isolé récemment en Allemagne (Hartelt *et al.*, 2007).

B. canis canis est trouvée en Europe, ***B. canis vogeli*** dans les zones tropicales et sub tropicales et ***B. canis rossi*** en Afrique.

T. annae a été isolée pour la première fois en Espagne.

B. conradae a été isolée en Californie.

Néanmoins cette répartition géographique n'est pas figée, car les chiens voyagent de plus en plus avec leurs propriétaires et peuvent se contaminer à l'étranger. De plus, les tiques peuvent s'adapter à de nouveaux biotopes qui sont eux aussi sujets à des variations.

I.2.2.4. Résumé des caractéristiques des piroplasmes du chien

B. canis canis est surtout trouvée dans les pays tempérés mais elle a aussi été isolée en Amérique en en Australie et en Afrique du Sud. Elle est transmise par *Dermacentor reticulatus*.

B. canis vogeli a une distribution cosmopolite et est surtout trouvée dans les pays tropicaux et sub tropicaux. Elle est transmise par *Rhipicephalus sanguineus*.

B. canis rossi est transmise par *Haemaphysalis leachi* et est présente au sud de l'Afrique.

Deux souches de *B. gibsoni* ont été identifiées : ***B. gibsoni sous type asia*** (trouvée en Asie) et ***B. gibsoni sous type california*** (isolée en Californie). *B. gibsoni* est transmise par *Haemaphysalis bispinosa*, *H. longicornis*, *H. leachi* et *Rhipicephalus sanguineus*

Une espèce de piroplasma a été isolée en Espagne en 2000 par Zhaler *et al.*, elle porte le nom de ***T. annae*** (Zhaler *et al.*, 2000). Elle a été isolée chez le chien, le chat et le renard. Sa

répartition géographique est limitée à certaines régions d'Espagne, du Portugal et d'Amérique du Nord. Elle n'a encore jamais été isolée en Australie, en Afrique ni en Asie (Criado-Fornelio *et al.*, 2007).

Cette classification est loin d'être définitive car de nouvelles espèces sont encore découvertes.

Tableau 1 : Caractéristiques des piroplasmes infectant le chien

	<i>B.canis.canis</i>	<i>B. canis vogeli</i>	<i>B.canis rossi</i>	<i>B. gibsoni</i>	<i>T. annae</i>
	famille de Babesiidés				famille des Theileriidés
	genre <i>Babesia</i>				genre <i>Theileria</i>
Particularités biologiques	pas de forme exo érythrocytaire transmission trans ovarienne et trans stadiale chez la tique				forme pré érythrocytaire dans les cellules lymphoïdes transmission uniquement trans stadiale chez la tique
Taille	taille supérieure à 1,5 µm				taille inférieure à 1,5 µm
	grande babésie (2 x 5 µm)			petite babésie (1 x 3 µm)	
Vecteur	<i>Dermacentor reticulatus</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	<i>Haemaphysalis leachi</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> <i>Haemaphysalis</i> spp.	<i>Ixodes hexagonus</i>
Répartition géographique	Europe sauf Royaume-Uni Et Asie	Région tropicale et sub-tropicale	Afrique du Sud	Asie, Amérique du Nord, Sud et Est de l'Afrique, plus rarement en Europe	Isolée en Espagne

.I.2.3.Classification phylogénétique

Cette classification permet d'une part de distinguer des sous-espèces au sein de l'espèce *Babesia canis*, mais aussi de retracer un arbre phylogénétique des piroplasmes grâce à une méthode objective et précise de séquençage d'une partie de leur génome.

I.2.3.1. Analyse de l'ADN codant pour l'ARNr 18S

L'ARNr 18S est une molécule composée de 1900 nucléotides environ, impliquée dans la lecture de l'ARN messager. Cette partie du ribosome vérifie que l'interaction entre le codon situé dans le site A du ribosome et l'anticodon de l'ARNt est correcte. L'ARN de la petite sous unité est donc le contrôleur de la fidélité de la traduction du message génétique en protéine.

On le trouve conservé dans l'ensemble des organismes vivants. Le gène codant pour sa synthèse est souvent utilisé pour réaliser des études de phylogénie.

Par un séquençage du gène codant pour l'ARNr 18S de *B. canis*, il est possible de différencier 3 sous-espèces qui sont morphologiquement identiques : *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* et *Babesia canis rossi*.

Ces sous-espèces occasionnent des signes cliniques différents chez leur hôte, n'ont pas la même distribution géographique et ne sont pas transmises par les mêmes tiques. De plus, la réponse immunitaire de l'hôte est assez spécifique et il existe peu de protection croisée entre ces sous-espèces.

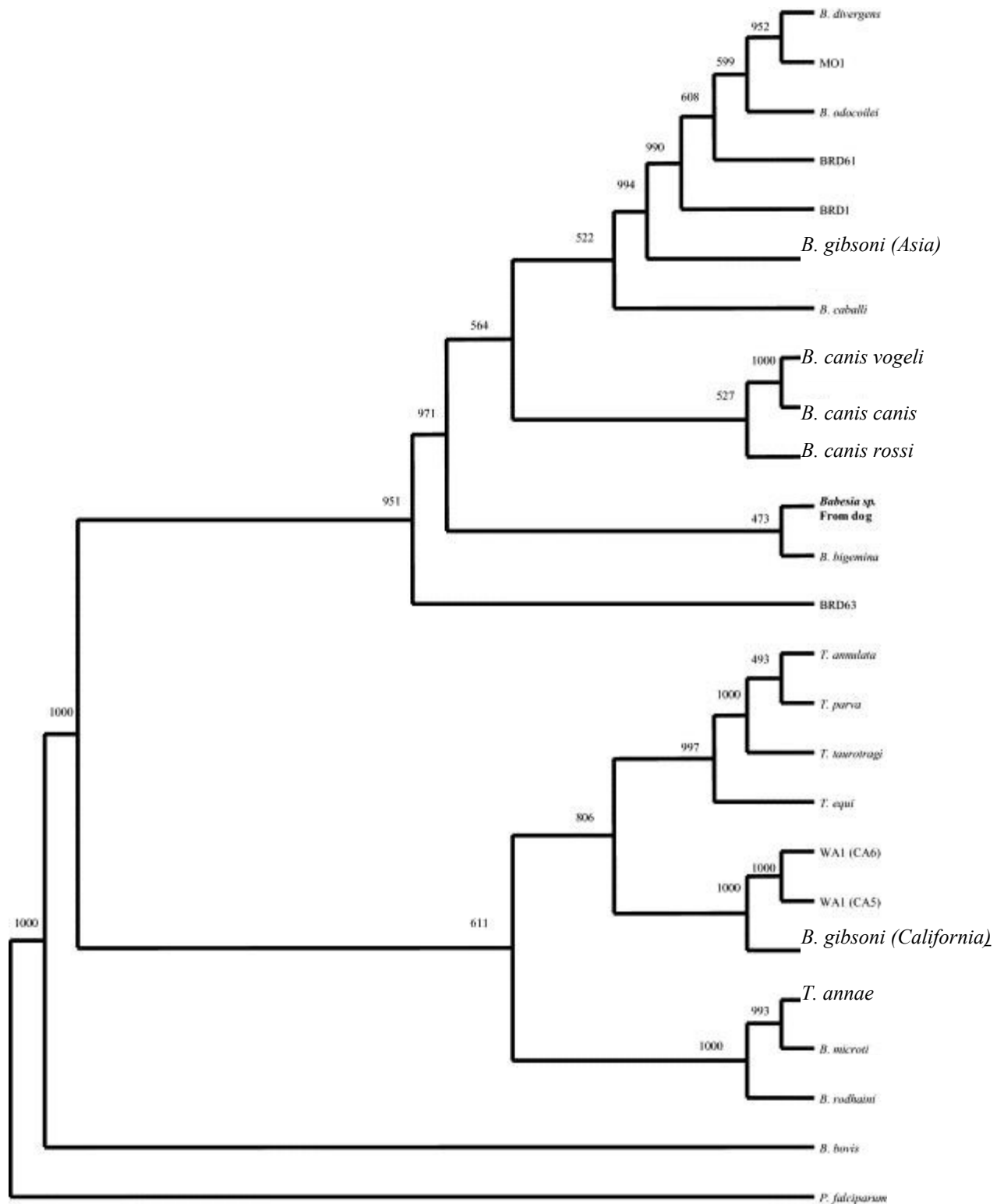
Un article, publié par Caccio *et al.* en 2002, affirme qu'il existe 98% d'identité entre les séquences de *B. canis canis* et *B. canis vogeli* (les 2% de différence sont dues à 27 substitutions de nucléotides et 7 délétions/insertions), 95,7% d'homologie entre celles de *B. canis canis* et *B. canis rossi* et 95,3% entre celles de *B. canis rossi* et *B. canis vogeli*. (Caccio *et al.*, 2002). Il montre aussi que *B. canis* est proche de *B. gibsoni*.

Un arbre phylogénique, réalisé à partir des séquences de l'ARNr 18S, par Birkenheuer *et al.* en 2004, montre que les sous types asiatique et californien de *B. gibsoni* sont très éloignés, si ***B. gibsoni Asia génotype* est proche de *B. canis* spp., *B. gibsoni california génotype* est classé avec les *Theileria* et est proche de *B. microti* et *T. anna*.** (Birkenheuer *et al.*, 2004).

La séquence de l'ARNr 18S de ***T. annae* est très proche de celle de *B. microti*.** Ce piroplasme fait clairement partie d'un clade contenant *B. microti*. (Kjemtrup *et al.*, 2000).

Cette analyse permet donc d'isoler un premier cluster contenant *B. canis canis*, *B. canis rossi*, *B. canis vogeli*. Elle isole ensuite un second cluster formé de *T. annae* et de *B. microti*. *B. gibsoni* est proche du cluster des *Babesia canis* néanmoins Birkenheuer *et al.* distinguent en 2004 un sous type isolé en Californie qui est plus proche du cluster formé par *T. annae* et *B. microti* (Figure 5).

Figure 5 : Arbre phylogénique classant les espèces de *Babesia* et celles de *Theileria* selon les séquences du gène codant pour l'ARNr 18S (d'après Birkenheuer *et al.*, 2004).



I.2.3.2. Analyse de l'ITS-2

Les ITS sont des introns qui séparent les gènes qui codent pour les ARN ribosomiques. Ces séquences n'étant pas transcrites, elles ne sont pas soumises aux pressions de sélection, ainsi les mutations ne sont pas délétères pour l'organisme et peuvent donc s'accumuler et être transmises à la descendance. Kjemtrup *et al.* en 2006, ont analysé une séquence ITS (ITS2) en l'amplifiant par PCR. Ils ont ensuite assemblé les séquences, puis les ont alignées et analysées. Ils ont enfin dressé un arbre phylogénique.

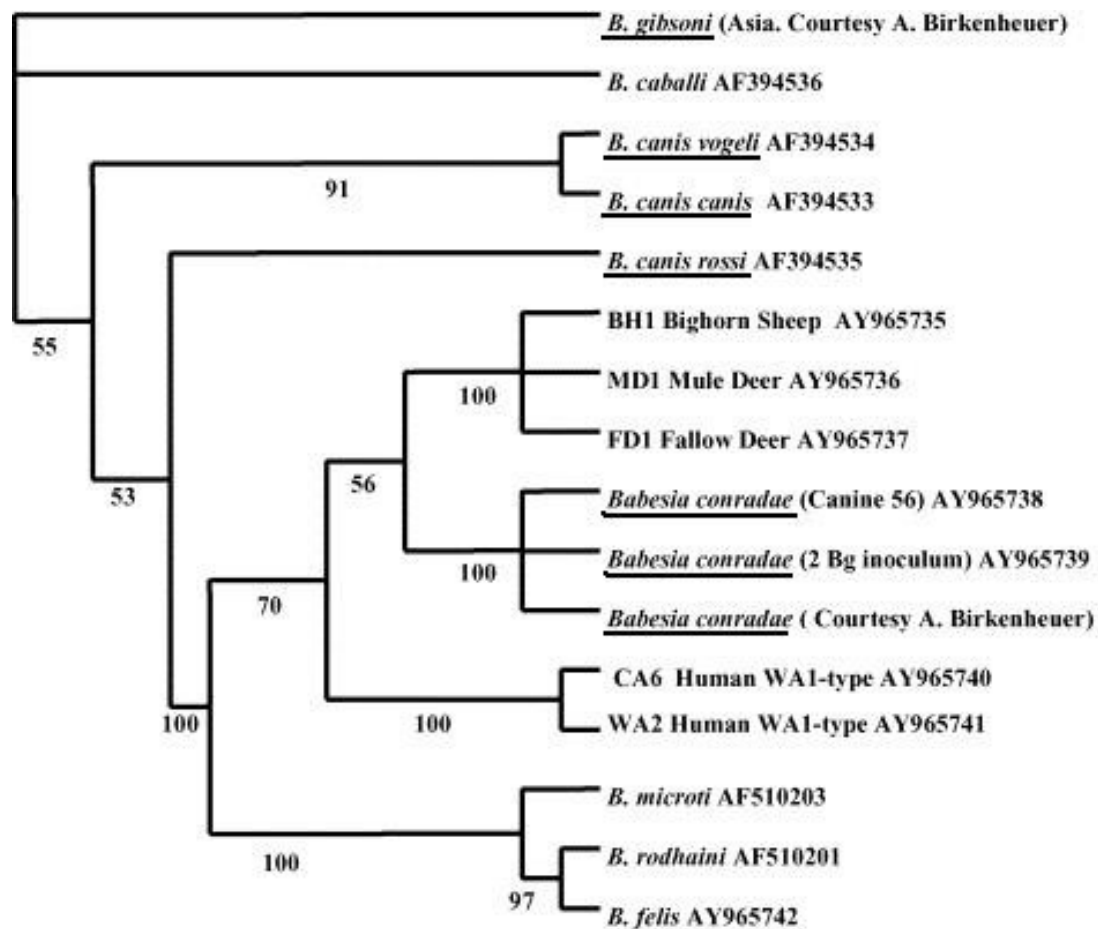
Il y a **beaucoup d'homologie entre *B. conradae* et les autres babésies humaines**, ce piroplasme est donc placé dans ce groupe.

L'ITS-2 de *T. annae* est **très proche de celle de *B. microti***, elles sont donc placées dans le même groupe.

L'ITS-2 des **3 sous espèces de *B. canis* sont très proches entre elles** et sont **proches de *B. gibsoni***, mais elles sont éloignées de *B. conradae*. (Kjemtrup *et al.*, 2006)

La classification phylogénique réalisée à partir de la séquence ITS-2 obtenue est identique à celle obtenue par analyse de l'ARNr 18S (Figure 6).

Figure 6 : Arbre phylogénétique classant les espèces et sous espèces de *Babesia* selon la similitude de leur séquence ITS2 (d'après Kjemtrup *et al.*, 2006). Les piroplasmes parasites du chien sont soulignés.



I.2.3.3. Analyse du cytochrome b

Il existe aussi d'autres classifications qui reposent sur le gène codant pour le **cytochrome b** qui est un élément de chaîne d'oxydo-réduction mitochondriale.

Ce gène présente plusieurs intérêts :

- Il est peu sujet au polymorphisme,
- Il est trouvé dans l'ADN mitochondrial de toutes les espèces,
- Il est extra chromosomique (il est situé dans l'ADN mitochondrial).

L'arbre phylogénique obtenu par Criado *et al.* en 2006 est identique à celui obtenu par analyse de l'ARNr 18S (Criado *et al.*, 2006).

I.2.3.4. Analyse de la protéine HSP70 et de la séquence codant pour cette protéine

L'HSP70 qui signifie *heat shock protein*, est une protéine de 70 kDa. C'est une protéine dite de stress ou de choc thermique qui est présente chez tous les êtres vivants et qui est synthétisée par la cellule à la suite de toute situation qui compromet sa survie. Son rôle consiste alors à protéger l'ensemble vital des protéines cellulaires. Ainsi, la réponse des protéines de choc thermique peut être considérée comme un mécanisme universel de défense contre toute forme d'agression.

La comparaison et l'analyse phylogénétique de l'HSP70 ont été réalisées par Yamasaki *et al.* en 2007 (Figure 7). La séquence codant pour cette protéine ne possède pas d'intron ce qui permet de la comparer entre toutes les espèces. L'ARN a d'abord été isolé puis transformé en ADN complémentaire par une RT-PCR et enfin amplifié par PCR. Trois produits issus de la PCR ont ensuite été séquencés et comparés aux séquences d'une banque de données.

L'analyse de la séquence codant pour la protéine permet de différencier trois grands groupes :

□ Le groupe A qui contient l'ensemble des babésies canines : *B. gibsoni*, *B. canis canis*, *B. canis vogeli* et *B. canis rossi*. Ce groupe contient aussi *B. bovis*, *B. ovis*, *B. caballi*, *B. odocoilei* et *B. divergens*.

Les **babésies canines** forment un **sous groupe bien individualisé**.

***B. canis canis* et *B. canis vogeli* sont les plus proches**, puis vient ***B. canis rossi* qui est la babésie la plus proche de ces deux babésies**.

la séquence codant pour la protéine HSP70 de ***B. gibsoni*** présente 86,6% d'homologie avec *B. canis vogeli*, 86,5% avec *B. canis rossi* et 86,2% avec *B. canis canis*, **ce qui permet**

de classer ce piroplasme dans le même sous groupe que les autres babésies canines.

❑ Le groupe B qui est constitué de *T. annulata*, *T. sergenti* et *T. cervi*.

❑ Le groupe C qui est constitué de *B. rodhaini* et *B. microti*.

T. annae n'a pas été étudiée dans cet article.

L'analyse de la séquence protéique de l'HSP70 fait apparaître les mêmes groupes (Figure 8).

Figure 7 : Arbre phylogénétique classant les espèces et sous espèces de *Babesia* et de *Theileria* selon la similitude de leur l'ARN codant pour l'HSP70 (d'après Yamasaki, 2007). Les piroplasmes parasites du chien sont soulignés.

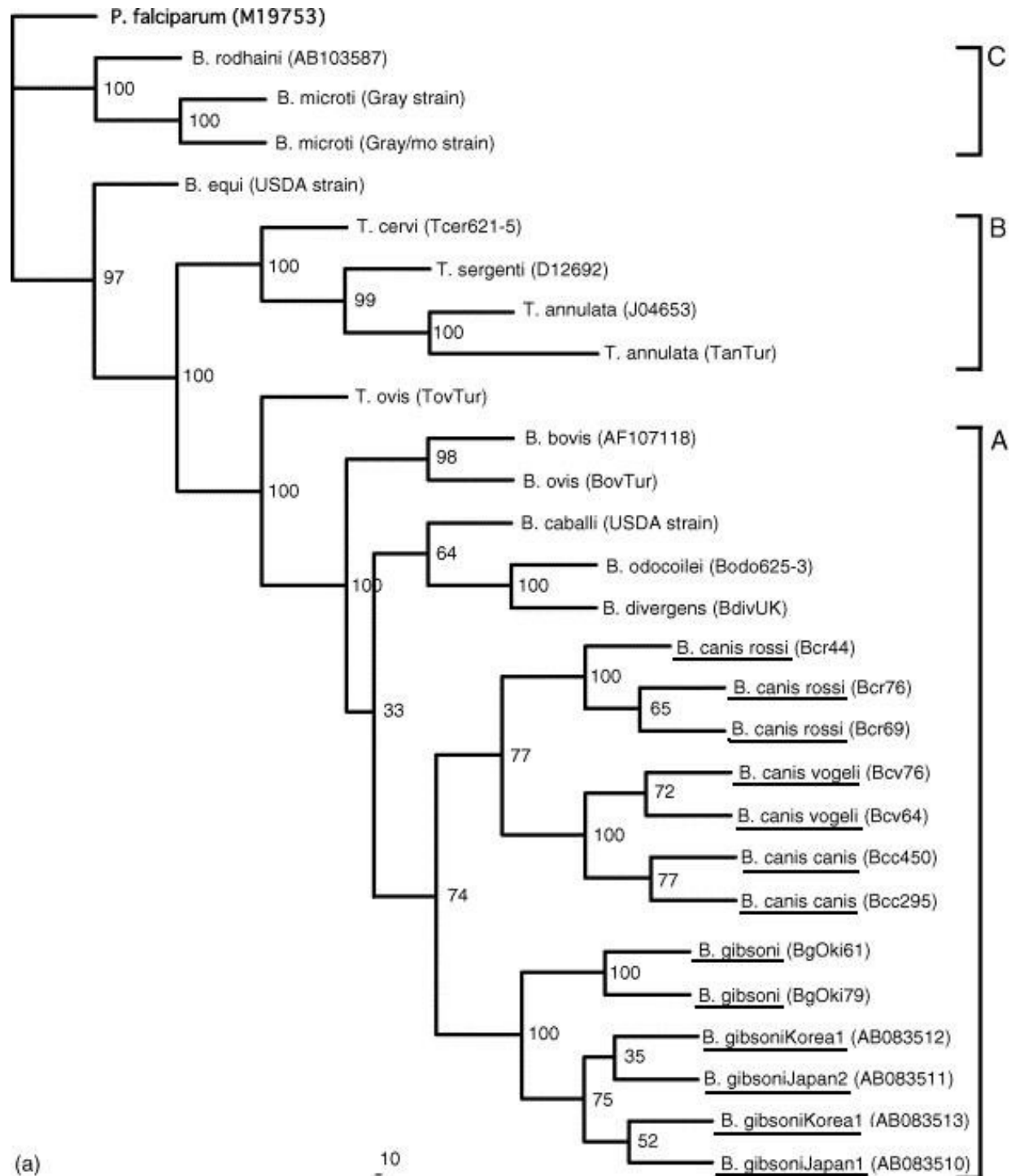
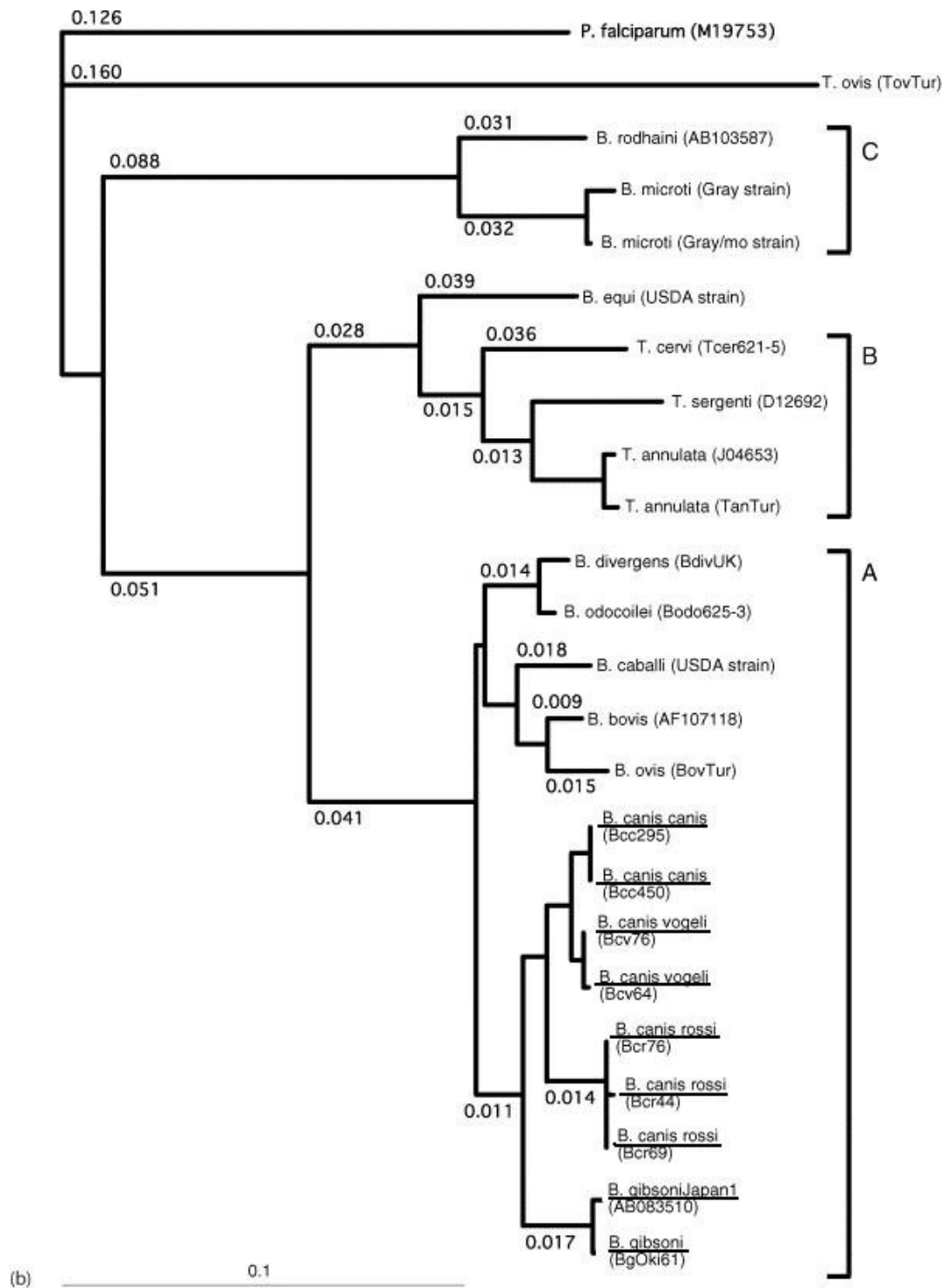


Figure 8 : Arbre phylogénétique classant les espèces et sous espèces de *Babesia* et de *Theileria* selon la similitude de leur protéine l'HSP70 (d'après Yamasaki, 2007). Les piroplasmes parasites du chien sont soulignés.



I.2.3.5. Conclusion

□ Relations entre les piroplasmes parasite du chien

À l'issue de l'étude de tous ces arbres phylogéniques, on peut conclure que ***B. canis canis* et *B. canis vogeli* sont les piroplasmes les plus proches génétiquement. *B. canis rossi* est ensuite la babésie la plus proche de ce groupe.** Certains auteurs considèrent que ces trois sous espèces de babésies forment un même sous groupe.

B. gibsoni est le piroplasma qui a le plus de similitude avec ce groupe. Il présente plus ou moins d'homologie selon la séquence étudiée pour réaliser l'arbre phylogénique. L'analyse de la séquence codant pour la protéine Hsp70, montre que cette babésie est en fait très proche des *Babesia canis* et appartient au même sous groupe.

Néanmoins certains auteurs, comme Birkenheuer *et al.* en 2004, différencient deux sous types de *B. gibsoni* qui possèdent des séquences codant pour l'ARNr 18S très distinctes et qui placent ***B.gibsoni Asia genotype* proche du sous groupe des *B. canis* et *B. gibsoni californi* genotype avec les *Theileria*.**

T. annae est très éloignée du groupe des *Babesia* et présente beaucoup d'homologie avec *B. microti*.

B. conradae est une babésie découverte très récemment et n'est prise en compte que dans la réalisation d'un arbre phylogénique, elle semble proche des babésies humaines et éloignée du sous groupe formé par *B. canis* spp. et *B. gibsoni*.

□ Relations entre ces piroplasmes et le reste des piroplasmes

Comme il a été indiqué ci-dessus, *B. canis* spp. et *B. gibsoni genotype asia* peuvent être regroupées dans le même sous groupe. Celui-ci est proche de *B. bovis*, *B. bigemina.*, *B. divergens*, *B. caballi* et *B.ovis*. l'analyse de la séquence codant pour la protéine HSP70 place tous ces piroplasmes dans un même grand groupe.

T. annae, *B. gibsoni genotype californi* et *B. conradae* sont quant à elles proches de *T. equi* et de *B. microti*. Ce qui les éloigne considérablement des autres babésies canines.

II. Épidémiologie des piroplasmoses et cycles évolutifs des piroplasmes

II.1. Epidémiologie

.II.1.1. Sources des parasites

Les sources de parasites sont **les tiques et les animaux malades ou porteurs asymptomatiques**. En effet, même les animaux présentant une parasitémie très faible et non décelable sur un frottis peuvent infecter les tiques chez qui le parasite se multipliera. Ces animaux représentent un réservoir pour le parasite.

Seules les tiques *Ixodidés* ont été identifiées comme étant les vecteurs de piroplasmes.

Ces tiques appartiennent aux genres *Rhipicephalus*, *Dermacentor* et *Haemaphysalis*. *Rhipicephalus sanguineus*, espèce cosmopolite est le vecteur principal au niveau mondial mais en France c'est *Dermacentor reticulatus* qui est la tique le plus souvent responsable de la transmission de piroplasme vient ensuite *Rhipicephalus sanguineus*. (Bourdeau et Guelfi, 1995)

.II.1.2. Présentation des vecteurs

II.1.2.1. Etude morphologique

Nous ne décrivons que l'appareil digestif et l'appareil génital de la femelle qui jouent un rôle très important dans l'entretien du cycle et dans la transmission des piroplasmes.

- *Appareil digestif*

Le tube digestif est constitué d'une bouche qui s'ouvre au dessus de l'hypostome, d'un pharynx musculueux, d'un œsophage court et fin, d'un estomac d'où partent des culs de sac qui

sont des caecums digestifs (aussi appelés intestin moyen), et enfin d'un rectum et d'un anus non fonctionnel.

A ce tube digestif, sont annexées deux **glandes salivaires** allongées de part et d'autre du corps de la tique. Elles sont formées de plusieurs types d'acinus, eux mêmes constitués de plusieurs types de cellules à granules. Le canal excréteur de chaque glande débouche dans un réservoir situé au dessus du pharynx, le salivarium, d'où la salive est inoculée à l'hôte vertébré par un orifice unique aboutissant à la bouche. **Chez la tique infestée, la salive est très riche en éléments parasitaires et est la seule matière infestante** (Koffi, 1999).

- *Appareil génital femelle*

La femelle possède un **ovaire tubuleux** en fer à cheval, et **deux oviductes** longs et sinueux en **contact étroit avec les caecums**, ce contact facilite le passage des piroplasmes ingérés par la tique de l'intestin vers l'oviducte. Ce passage permet une contamination de l'ovaire et ainsi la transmission du parasite aux descendants de la tique.

La transmission **trans-ovarienne et trans-stadiale** permettent la survie du piroplasme dans les populations de tiques pendant plusieurs générations.

II.1.2.2. Biologie

Alimentation

Les *Ixodidés* sont strictement **hématophages** à tous les stades.

Ce sont des parasites intermittents (ou stationnaires) et donc qui ont un double habitat : l'hôte et le milieu extérieur. Suivant l'espèce de tique et le stade évolutif, les tiques sont plus ou moins spécifiques d'hôte.

La fixation de la tique sur son hôte se fait en général à un endroit où la peau est fine (oreilles, ars, mamelles, périnée) ; la tique enfonce alors ses chélicères, secrètent une salive qui digère les tissus puis introduit son hypostome, les pédipalpes s'écartent et restent en surface. Enfin une salive particulière se solidifie et forme autour de l'hypostome un manchon en lamelle concentrique, le ciment, qui permet une fixation extrêmement solide.

Lors du repas sanguin, la tique injecte une salive avec des propriétés anticoagulantes et vasodilatatrices. Elle possède aussi des substances qui facilitent la survie et la diffusion des agents pathogènes transmis. La salive contient notamment des enzymes (phosphatases, estérases, phénoloxydases, hémolysine), des prostaglandines, qui ont un rôle anti-inflammatoire, des facteurs histaminiques : histamine-like (ils provoquent une inflammation qui permet un afflux de sang) et anti histaminique (qui évitent que l'inflammation soit trop importante).

La larve et la nymphe se gorgent en absorbant une quantité de sang peu importante, les femelles non fécondées ne se gorgent que partiellement (c'est ce qu'on appelle la diapause trophique virginale). Les femelles fécondées ont d'abord une phase de gorgement lent, qui se poursuit par une phase de gorgement rapide au cours de laquelle elles absorbent plusieurs millilitres de sang et le concentrent en rejetant dans leur salive l'eau et les métabolites.

A la fin du repas sanguin, une dernière salive provoque le ramollissement du manchon, et permet à la tique de se libérer.

Les Ixodidés ne prennent qu'un seul repas sanguin à chaque stade de leur cycle de vie, donc en l'absence de toute contamination, ce n'est jamais le stade parasite infecté qui est infectant.

Reproduction

L'accouplement se fait le plus souvent sur l'hôte, le mâle enserre avec ses pattes le capitulum de la femelle, avec son rostre, il écarte l'orifice génital de la femelle et dépose un à deux spermatophores. Les mâles meurent peu de temps après l'accouplement tandis que les femelles fécondées se gorgent abondamment puis se laisse tomber sur le sol.

Le temps de développement des œufs s'échelonne entre deux jours et plusieurs semaines selon les conditions climatiques puis la femelle pond dans un endroit à l'abri de la lumière. Elle meurt ensuite.

Les œufs éclosent, après une période d'incubation de 2 à 36 semaines, selon les espèces et les conditions microclimatiques. De chaque œuf sort une larve.

II.1.2.3. Cycles évolutifs des deux vecteurs principaux en France

Dermacentor reticulatus est une tique **triphase** c'est-à-dire qu'elle prend ses 3 repas sanguins sur 3 hôtes différents. Cette espèce est **ditrope** c'est-à-dire qu'elle ne parasite que deux types d'hôtes différents, la larve et la nymphe se nourrissent sur les oiseaux et les petits mammifères et les adultes sur les grands mammifères. Elle est **exophile**. Cette espèce a une activité maximale à une température de 18°C, elle est donc adaptée aux températures tempérées ce qui explique sa répartition géographique et sa période d'activité (actif pendant une grande partie de l'année avec un arrêt pendant les mois les plus chauds).

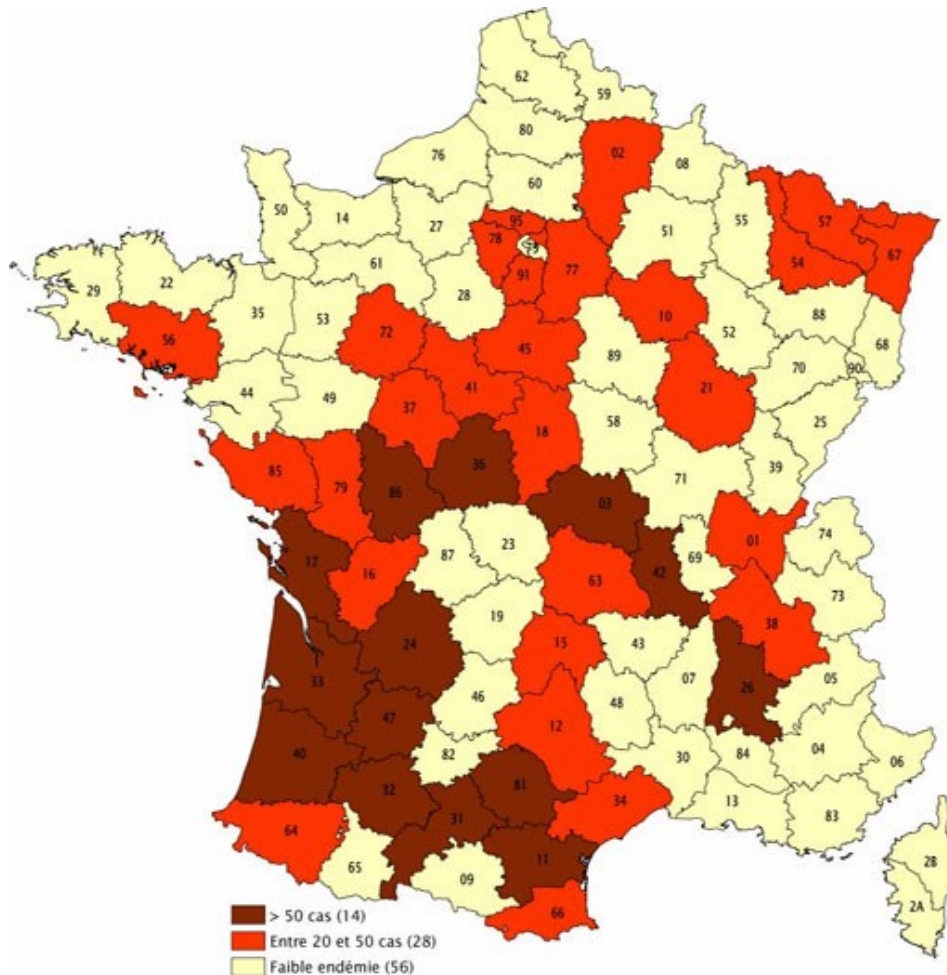
Rhipicephalus sanguineus, quant à elle, est une tique **triphase, monotrope** dont l'hôte est le chien, et **endophile** : on la trouve surtout à l'intérieur des maisons, des chenils...

Cette espèce a une activité maximale à une température de 24°C, elle est donc adaptée aux températures chaudes ce qui explique sa répartition géographique. Cette tique a donc une activité ininterrompue durant l'année avec un cycle qui touche uniquement le chien.

II.1.3. Prévalence des piroplasmoses canines en France

Les tiques vectrices sont retrouvées partout en France, mais il existe des régions plus infestées que d'autres, car elles possèdent un environnement plus favorable. Il faut néanmoins nuancer la cartographie théorique de la répartition des tiques car il peut exister des microclimats favorables au développement de celles-ci, à cela s'ajoutent des variations climatiques qui peuvent influencer sur la distribution et la période d'activité des tiques. Une enquête nationale menée entre 2003 et 2004 auprès de 1001 vétérinaires, en France métropolitaine, a montré que les foyers de piroplasmose sont mouvants ; certaines zones jusqu'alors fortement infectées deviennent faiblement enzootiques tandis que d'autres longtemps considérés comme vierges deviennent infectés (Bourdoiseau et Renard, 2005) (Figure 9). Cette enquête met en évidence un foyer de forte enzootie dans le Sud-Ouest et en périphérie du Massif central.

Figure 9 : Nombre de cas de piroplasmoses canines par cabinet et par an (d'après Bourdoiseau et Renard, 2005)



Selon la tique vectrice, la babésiose présente un caractère saisonnier ou non. En effet, *Dermacentor reticulatus*, est une espèce qui est active pratiquement de manière continue avec une pause en été et en hiver, la piroplasmose canine transmise par celle-ci présente un caractère saisonnier net (elle sévit au printemps et surtout à l'automne et est plus rare en hiver). Comme elle est exophile, les animaux malades sont surtout les animaux vivant ou ayant accès à l'extérieur (chien de chasse...). *Rhipicephalus sanguineus*, espèce endophile, est active toute l'année dans les chenils ou présente un pic du printemps à la fin de l'été.

Néanmoins, la validation complète de la cartographie théorique de la répartition des cas de piroplasmoses nécessiterait de disposer d'échantillonnages sur le terrain plus nombreux, ainsi qu'une période d'étude plus longue. De plus, l'unité clinique, c'est-à-dire le

nombre de cabinet répondant à l'enquête, est satisfaisante en quantité mais doit être affinée : les zones frontières entre les départements, ainsi que les zones peu représentées doivent être multipliées afin d'affiner et de confirmer les données enregistrées.

.II.1.4.Facteurs favorisant la transmission des piroplasmoses canines.

II.1.4.1. Le mode de vie

Le mode de vie du chien joue un rôle important dans l'exposition du chien aux tiques. **Les chiens de chasse et les chiens de garde** qui passent une grande partie de temps à l'extérieur sont de loin les plus exposés (Bourdeau et Guelfi, 1995). Lors d'une étude statistique publiée en 1974, réalisée sur 4 ans et sur 1100 chiens, Robin notait que 50% des chiens malades étaient des chiens de chasse, 30% des chiens de garde et 20% des chiens de compagnie (Robin, 1974).

Les chenils sont aussi une source de tiques et sont des zones à risque pour les animaux qui y vivent ou qui y transitent.

Le risque est plus faible pour les animaux vivant en appartement, mais les promenades dans les bois constituent un risque non négligeable de morsure par les tiques. De plus l'engouement pour les sports canins ou les propriétaires qui voyagent avec leurs animaux de compagnies sont aussi des facteurs de risque.

II.1.4.2. L'âge

La piroplasmose est plus fréquente chez les jeunes (entre 2 mois et 2 ans) et est rare chez les chiots de moins de deux mois (Bourdeau et Guelfi, 1995). Cependant il a été rapporté que des chiots Greyhounds aux Etats-Unis peuvent être touchés par une anémie liée à une transmission verticale de *B. gibsoni* et de *B. canis* (Boozer et Mancintire, 2003).

II.1.4.3. La race

Toutes les races de chiens sont sensibles et réceptives indépendamment de leur sexe. (Bourdeau et Guelfi, 1995). Néanmoins une enquête plus ancienne, effectuée sur 3093 chiens en France, sur une période de 2 ans (Perchereau, 1986), affirme qu'il existe des races plus résistantes à la maladie (comme le beagle, le fox terrier) et d'autres plus sensibles (comme

l'épagneul breton, le cocker, le teckel...). Certaines publications américaines affirment également que des races sont plus sensibles que d'autres. Boozer et Macintire soulignent que *B. gibsoni* sous type asiatique affecte surtout les chiens type Pitt bull et la piroplasmose se traduit souvent par des symptômes discrets (Boozer et Mancintire, 2003).

II.1.4.4. Causes favorisantes diverses

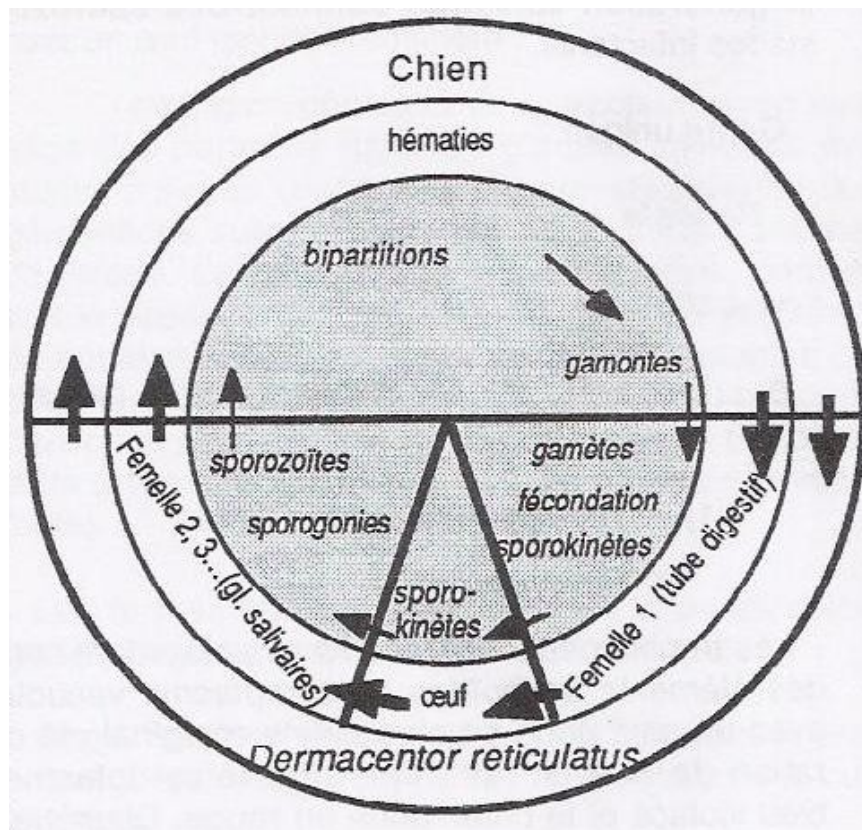
Les tiques peuvent transmettre durant leur repas sanguin **d'autres parasites** en plus des piroplasmes capables de détériorer le seuil de résistance de l'animal ou d'engendrer une réaction plus grave ou atypique de la piroplasmose (Koffi, 1999).

D'une façon générale, la **baisse des défenses immunitaires de l'organisme** (suite à des infections quelconques, une splénectomie, une intervention chirurgicale, une maladie intercurrente, la corticothérapie...) peuvent entraîner l'apparition de symptômes chez un chien infecté latent.

II.2. Cycle évolutif des parasites du genre *Babesia*

Le cycle est **hétéroxène** avec une reproduction asexuée chez un hôte vertébré et une reproduction sexuée qui se fait d'une part chez l'hôte vertébré avec la formation de gamontes endo-érythrocytaire et d'autre part chez l'hôte invertébré (la tique) avec la formation de gamète et la fécondation qui donne un œuf mobile (ookinète) (Figure 10).

Figure 10 : Cycle évolutif de *Babesia canis* (d'après Bussiéras et Chermette, 1992)



.II.2.1.Développement chez le chien

II.2.1.1. Inoculation

Les babésies sont le plus souvent transmises suite à une **morsure de tique**, néanmoins, elles peuvent être transmises à la faveur d'une transfusion sanguine, à partir d'un donneur infecté ou de matériel souillé.

B. gibsoni et *B. canis* peuvent aussi être transmises chez le chien lors d'une **morsure à la suite d'une bagarre ou durant la gestation de la chienne** (Boozer et Mancintire, 2003).

II.2.1.2. Pénétration dans l'hématie

Les piroplasmes sont **spécifiques d'hôte**. Les sporozoïtes sont présents dans les glandes salivaires des tiques et sont transmis à la fin du repas sanguin.

Ils entrent directement dans les hématies.

Le mécanisme complet de la **pénétration** du parasite n'est pas totalement connu. Il comporte quatre étapes principales (Figure 11).

☐ l'attachement

Les parasites se fixent aux hématies grâce à des glycoprotéines de surface extracellulaires appelées *variable merozoïtes surface antigens (VMSA)* (Yokoyama *et al.*, 2006). Les anticorps de l'hôte sont dirigés contre ces glycoprotéines.

☐ Réorientation du piroplasme

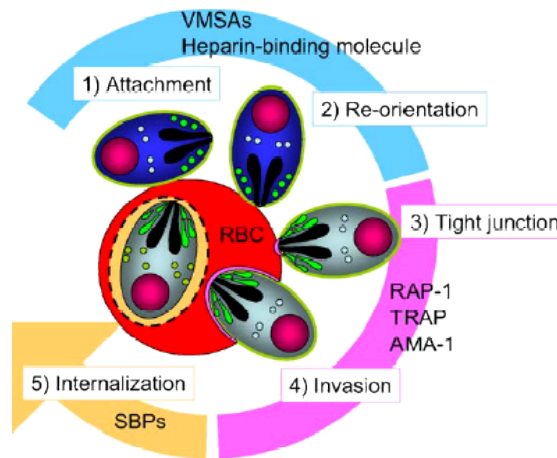
Le parasite oriente son pôle apical vers l'hématie de sorte que les rhoptries (organes sécrétoires du pôle apical) soient au contact de l'hématie. Il forme alors des jonctions serrées avec les protéines de l'hématie.

Le parasite sécrète ensuite des protéines grâce aux éléments de son complexe apical (principalement les rhoptries et les micronèmes). On a isolé chez *B. bovis* une protéine nommée RAP-1 et deux protéines ressemblant à des protéines d'attachement nommée AMA-1 et TRAP. Progressivement, il s'internalise dans l'hématie grâce à une fusion de leurs membranes (Yokoyama *et al.*, 2006).

☐ Invagination de la membrane de la cellule hôte et pénétration

Lorsque le parasite a pénétré dans l'hématie, il sécrète des protéines grâce à un organite appelé « corps sphérique ». elles servent probablement à dissoudre la vésicule parasitophore (Yokoyama *et al.*, 2006).

Figure 11 : Représentation schématique de l'invasion d'un érythrocyte par *B. bovis* (d'après Yokoyama *et al.*, 2006)



Attachement du parasite à l'hématie grâce à des récepteurs à l'héparine et des protéines de la famille VMSA (1). Réorientation du piroplasme (2). Formation de jonctions serrées avec la membrane du globule rouge (3). Invasion grâce à la sécrétion de RAP-1, TRAP, AMA-1 par les rhoptries (4). Internalisation du parasite et sécrétion de SBPs pour lyser la vacuole parasitophore (5).

II.2.1.3. Multiplication

Au sein des hématies, les **sporozoïtes** deviennent des **trophozoïtes**.

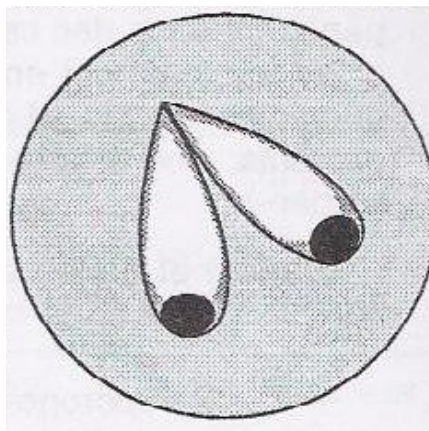
Les trophozoïtes se présentent comme des éléments amiboïdes au cytoplasme vacuolaire avec un petit grain de chromatine marginal. La coloration de May-Grünwald Giemsa fait apparaître le cytoplasme en bleu violacé et la chromatine en rouge. Leur diamètre est de 2 à 4 μm . Le parasite est limité par une membrane mince et ne possède pas d'appareil apical.

Ils sont situés dans le stroma d'une hématie sans aucune vacuole parasitophore. Ils se nourrissent du contenu de l'hématie par pinocytose ; on retrouve de l'hémoglobine dans des vacuoles intra-cytoplasmiques puis elles sont totalement digérées et il ne reste plus aucun pigment.

Le trophozoïte se modifie ensuite : il se forme un complexe apical avec une paroi externe plus épaisse et plus complexe. Le noyau émet deux bourgeons qui font saillie à l'extérieur et se développent en donnant deux cellules filles possédant chacune un noyau, un cytoplasme et un complexe apical : ces cellules sont appelées **mérozoïtes**.

Les mérozoïtes sont des éléments allongés en forme de goutte d'eau ou de poire. Ils résultent de la division binaire du parasite, c'est la **forme de multiplication** du parasite chez le chien. L'aspect classiquement décrit pour *B. canis* est la forme dite bigéminée (Figure 12). Cette forme est constituée de deux parasites piriformes contenus dans une même hématie et réunis par leur extrémité effilée en formant entre eux un angle aigu. Leur cytoplasme est coloré en bleu clair (en coloration M.G.G). Le noyau, situé généralement au pôle le plus arrondi a une forme souvent irrégulière, il est de couleur rouge foncé (Jolivet et Marchand, 1974).

Figure 12 : Forme bigéminée de *Babesia canis* (d'après Bussiéras et Chermettte, 1992)



Il peut y avoir des divisions multiples au sein de l'hématie qui peut alors contenir 4, 8, ou 16 parasites.

La multiplication asexuée peut se produire indéfiniment jusqu'à ce que les réactions immunitaires de l'hôte viennent contrôler le parasite.

Il apparaît ensuite d'autres formes comme des formes annulaires, amiboïdes et également des formes plus ou moins ovalaires qui ont cessé toute division et qui sont l'équivalent de **gamétocytes**. Seuls ces éléments sont capables d'assurer la suite du cycle et de r  infester une tique lors d'un repas sanguin.

.II.2.2. Développement chez la tique

II.2.2.1. Infestation

A la faveur d'un repas sur un chien infesté, la tique absorbe des hématies parasitées.

Dans l'intestin moyen de la tique, les parasites ingérés sont détruits, à l'exception des gamontes qui sont libérés dans le tube digestif. Ils pénètrent alors dans les cellules de l'épithélium intestinal, et se transforment en gamètes de 4 à 7 µm avec d'un côté une épine apicale et de l'autre 5 à 7 fins prolongements. Cette morphologie leur a valu le nom de **corps en étoile ou corps rayonné** (« Strahlenkörper » en Allemand).

Cette forme a été mise en évidence en 1905 par Koch et Kleine qui ont émis la première suspicion de reproduction sexuée chez la tique. Grâce au microscope électronique, Rudzinka *et al.* ont pu étudier ces éléments individuels ou en fusion deux à deux. Certains avaient un cytoplasme plus dense que d'autre et la multiplication ne se faisait qu'entre un corps rayonné à cytoplasme dense et un à cytoplasme clair, ces observations confirment, les chercheurs en ont conclu que ces corps rayonnés sont des gamontes. (Rudzinka *et al.*, 1983)

II.2.2.2. Multiplication

La fécondation intervient 2 à 4 jours après la fin du gorgement de la tique et donne un zygote d'abord sphérique puis allongé et mobile (**ookinète**) mesurant entre 7 et 8 µm (Euzéby, 1988). A l'intérieur de celui-ci apparaît une vacuole dans laquelle se forme un élément en massue, ou kinète qui quitte la cellule intestinale, passe dans la cavité générale et pénètre dans une nouvelle cellule qui peut être une hématie, de l'hémolymph, une cellule de l'épithélium de Malpighi, une fibre musculaire ou un ovocyte (ce qui explique la présence du parasite dans les œufs de la tique). Une phase de multiplication donne naissance à des **sporokinètes** qui vont rester quiescents.

❑ Développement des *Babesia* dans les cellules somatiques de la tique

Les sporokinètes situés dans les cellules somatiques, sont un cul de sac épidémiologique : même s'ils continuent à se multiplier indéfiniment, ils ne seront jamais transmis à l'hôte vertébré. Ils ne participent donc plus au cycle de la maladie (Koffi, 1999).

❑ Développement des *Babesia* dans les ovocytes puis dans les œufs de la tique

Les sporokinètes qui ont envahi les ovocytes entrent en phase de latence jusqu'à la formation de la larve de tique. Environ 24 heures après le début du repas sanguin de la larve, ils reprennent leur multiplication et envahissent différentes cellules de l'acarien, en particulier les glandes salivaires (Koffi, 1999).

□ Développement des *Babesia* dans les glandes salivaires de la tique

Environ 48 heures après le début du repas sanguin, les sporokinètes envahissent les cellules des acini des glandes salivaires. Chaque sporokinète devient un volumineux sporonte dans lequel se forme des milliers de petits **sporozoïtes** qui sont infestants pour le chien après deux à trois jours de maturation. Ils sont ensuite inoculés avec la salive.

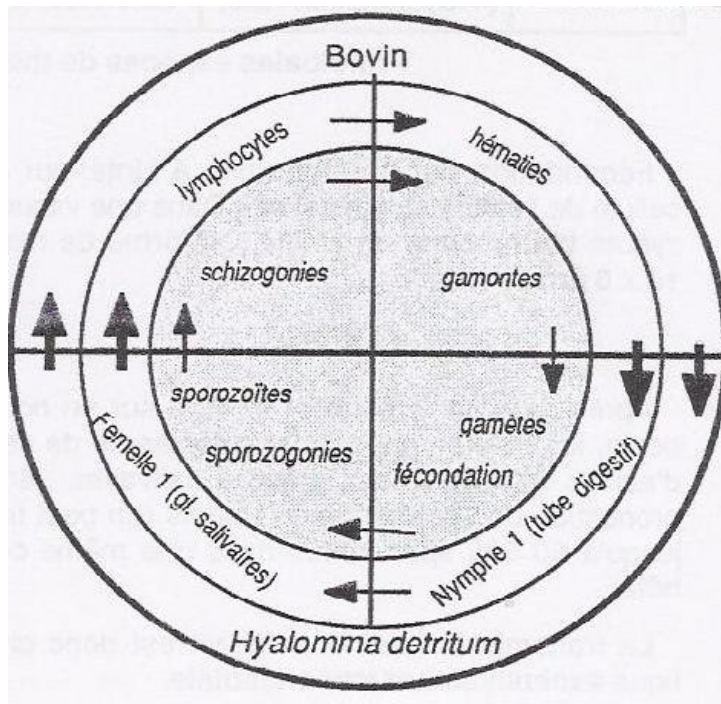
Dans une seule glande salivaire, il existe plusieurs dizaines de milliers de sporozoïtes qui sont transmis de la larve à la nymphe puis de la nymphe à l'adulte (transmission trans-stadiale).

Les parasites peuvent donc se transmettre de deux façons au sein de la tique : une transmission **trans-ovarienne** et une transmission **trans-stadiale**. Ainsi, si une tique s'infeste, non seulement les larves de la génération suivante sont infestantes, mais l'infection persiste et est aussi transmissible par les nymphes et les adultes.

II.3.Particularités du cycle des parasites du genre *Theileria*

Le cycle est **hétéroxène** et se déroule entre un hôte vertébré et une tique (Figure 13).

Figure 13 : Cycle évolutif de *Theileria annulata* (d'après Bussiéras et Chermette, 1992)



.II.3.1.Développement chez le chien

A la faveur d'un repas sanguin, la tique inocule des sporozoïtes à l'hôte vertébré.

□ Phase lymphocytaire

A la différence des *babésiidés*, les sporozoïtes inoculés par la tique pénètrent rapidement dans des **cellules lymphoïdes** (macrophages, monocytes ou lymphocytes).

L'augmentation du volume du parasite avec divisions répétées du noyau, donne des **trophozoïtes puis des schizontes**. Les lymphocytes infectés, stimulés par la présence des parasites entreprennent alors des divisions ininterrompues accompagnées de division synchrone des schizontes. (Bussiéras et Chermette, 1992).

Au bout d'une semaine environ, les schizontes acquièrent un appareil apical et deviennent alors des **m rozo ites**.

□ Phase  rythrocytaire

Les m rozo ites infestent ensuite les ** rythrocytes et s'y divisent** (Uilenberg, 2006). Sur un frottis sanguin, on peut observer des formes en bâtonnet ou en virgule, des formes annulaires et plus rarement des formes en tétrades.

.II.3.2.Développement chez la tique

Chez la tique vectrice, la transmission du parasite est **uniquement trans-stadiale** (habituellement de la nymphe à l'adulte) et la multiplication des parasites (sporogonies), se réalise **uniquement dans les glandes salivaires**. (Bussiéras et Chermette, 1992).

III. Pathogénie

La période d'incubation du parasite varie en fonction de l'espèce de piroplasme : 7 à 21 jours pour *B. gibsoni*, 10 à 21 jours pour *B. canis* et environ 13 jours pour *T. annae*. (Boozer et Macintire, 2003)

III.1. Phénomènes fondamentaux

Ce chapitre a pour but de décrire dans les grandes lignes les actions pathogéniques réalisées par les piroplasmes afin de comprendre les symptômes.

.III.1.1. Hémolyse intra-vasculaire

Elle est due à la sortie des piroplasmes des hématies parasitées.

En effet, la rupture des hématies parasitées, consécutive à la multiplication parasitaire, constitue le mécanisme le plus important responsable de l'hémolyse. La fragilisation osmotique des hématies est aussi mise en cause. Enfin, sur les hématies parasitées ou non, se déposent des complexes immuns qui lysent le complément et entraînent une lyse intra vasculaire des globules rouges.

Les conséquences de cette hémolyse sont : **une anémie** à l'origine d'une anoxie tissulaire, une **hémoglobulinémie**, une activation du **système des kinines** ainsi que du **système de la coagulation**.

.III.1.2. Adhérence des hématies

On observe, dans les capillaires de certains organes des phénomènes d'agglutination d'hématies parasitées, et d'adhérence entre ces hématies et les endothéliums vasculaires.

Ces complexes sont à l'origine **d'obstacle à la circulation locale dans** certains organes et d'ischémie.

.III.1.3. Production de complexes immuns

Les antigènes sont de deux types : des **antigènes somatiques** (pariétaux et cytoplasmiques) et les **antigènes d'excrétion sécrétion** ou exo antigènes.

- Les antigènes pariétaux sont moins immunogènes que les exo antigènes. Ils ont une structure glycoprotéique comme les exo-antigènes. Les antigènes cytoplasmiques sont essentiellement des enzymes (estérases et protéases) et sont libérés suite à la lyse du parasite.

- Les antigènes d'excrétion sécrétion ou exo-antigènes sont des glycoprotéines de 60 à 70kDa sécrétées par les piroplasmes et qui s'accumulent dans le plasma des individus infectés.

Les anticorps peuvent réagir avec des antigènes circulant dans le plasma et former des **immuns complexes** qui se déposent sur les membranes érythrocytaires (ce qui augmente l'hémolyse), les endothéliums des vaisseaux (ce qui induit un processus d'activation plaquettaire et la formation de thrombus) et les membranes basales des néphrons (produisant des glomérulonéphrites).

Lors de la pénétration des piroplasmes dans les hématies, il y a un dépôt d'antigènes parasites (essentiellement d'exo-antigènes) sur les membranes des hématies parasitées ou saines. Ces globules rouges subissent ensuite une hémolyse à médiation immune (Le système immunitaire sensibilisé contre les antigènes détruit les hématies porteuses d'antigènes).

Ces immuns complexes sont donc responsables de l'**hémolyse**, de la **thrombocytopénie** et de **glomérulonéphrite**.

.III.1.4. Thrombose

L'existence de caillots multiples dans divers viscères semblent être dus à un processus de **coagulation intravasculaire disséminée**. Ces thrombus causent ensuite une hypoxie tissulaire, cellulaire (à l'origine de diminution des capacités hépatiques, d'une hypoxie cérébrale, de nécrose tissulaire au niveau des extrémités...) (Bussiéras, 1990).

.III.1.5.Choc

Le phénomène de choc est dû à une **hypotension** et une **augmentation de la perméabilité vasculaire** (Bussiéras, 1990).

Ces phénomènes vasculaires sont eux-mêmes secondaires à l'activation des kinines (par les protéases parasitaires et l'hémoglobine) et à l'anoxie liée à l'anémie.

Le choc peut également procéder de l'action des **anaphylatoxines** issues de la cascade du complément amorcée par les complexes immuns. Ce syndrome joue un rôle essentiel dans l'évolution fatale de certaines babésioses (Bussiéras, 1990).

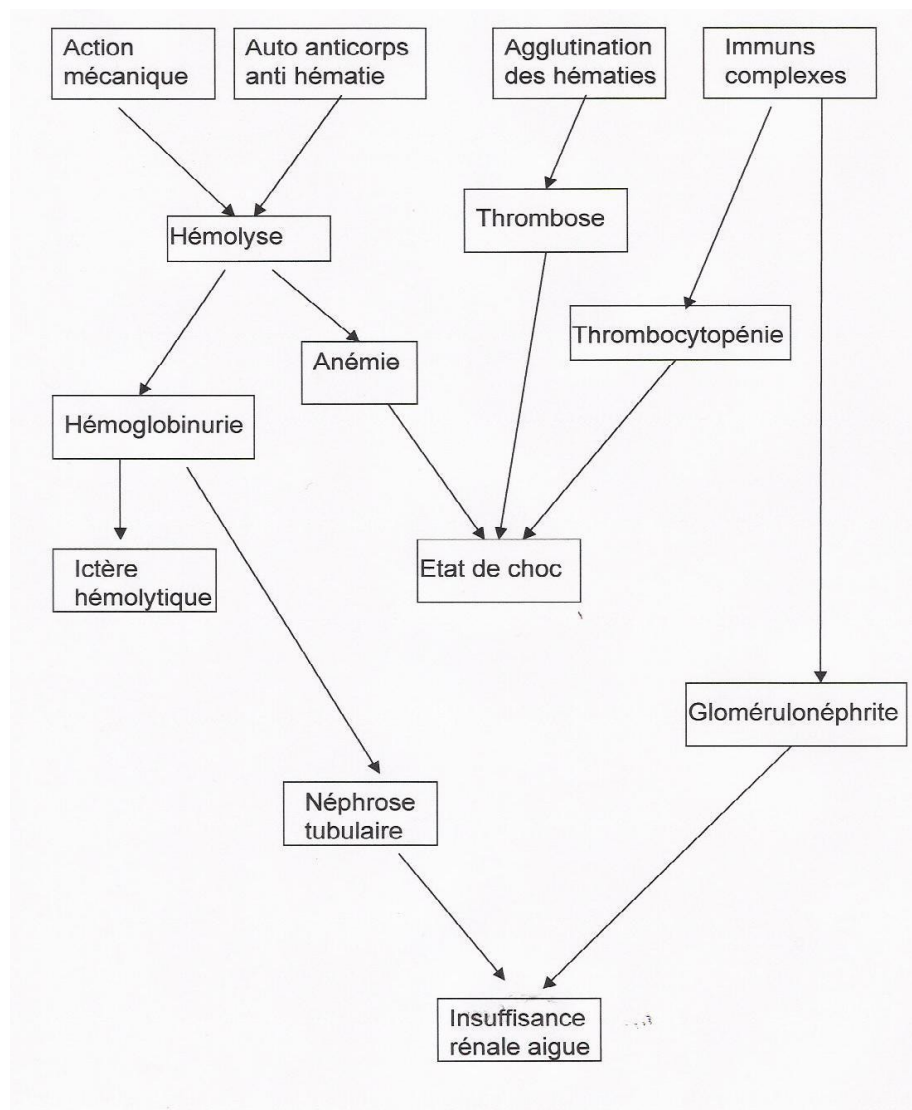
.III.1.6.Hémolyse extra-vasculaire

Dans diverses piroplasmoses, on observe une hémolyse très forte due à **la phagocytose d'hématies dans la rate, le foie et même dans le sang circulant par les monocytes**.

Cette phagocytose touche les hématies parasitées mais aussi non parasitées. Ces hématies sont reconnues comme étrangères par les macrophages de l'organisme à cause de modifications qui peuvent être dues au dépôt d'immuns complexes, à l'action de protéases parasitaires, aux déformations des hématies cons cutes à la présence des piroplasmes, à leur passage dans des capillaires partiellement obstrués.

Elle a pour conséquence une **anémie, une bilirubinémie, une splénomégalie**.

Figure 14 : Phénomènes fondamentaux de pathogénie des piroplasmoses (d'après Pagès et Trouillet, 1984)



III.2.Particularités pathogéniques des différents piroplasmes

L'expression clinique est très variée. De plus, tous les piroplasmes n'ont pas la même virulence et donnent des tableaux cliniques différents.

.III.2.1.Pathogénie où dominant des phénomènes de chocs, thrombose et agglutination des hématies dans les capillaires

L'espèce de *Babesia canis* n'est pas homogène. Elle est constituée de plusieurs sous espèces qui diffèrent les unes des autres par leur équipement enzymatique, leur antigénicité et leur pouvoir pathogène.

L'infection par *B. canis* peut causer beaucoup de signes cliniques différents : anémie, thrombocytopénie, léthargie, anorexie, splénomégalie, hémoglobinurie, bilirubinurie, fièvre...

Les cas sévères peuvent être accompagnés d'insuffisance rénale (même si celle-ci apparaît dans seulement moins de 3% des infections à *B. canis*), d'un syndrome de détresse respiratoire, de coagulation intra vasculaire disséminée, d'un syndrome neurologique (Boozer et Macintire, 2003).

III.2.1.1.*Babesia canis rossi*

B. canis rossi est la plus virulente des *B. canis*. Elle est présente en Afrique du Sud, où elle est la plus répandue. A l'Onderstepoort Veterinary Academic Hospital (OVAH), en Afrique du Sud, 12% des malades ont une babésiose et environ un tiers des chiens hospitalisés meurent malgré le traitement (Boozer et Macintire, 2003).

Cette sous-espèce engendre soit une **hémolyse** (due probablement à une réaction auto immune) ou une réaction inflammatoire importante et difficile à maîtriser (Furlanello *et al.* 2005). Des études ont montré que 50% des chiens infectés par cette sous-espèce souffrent d'une anémie sévère, 32% d'une anémie modérée, et enfin 18% n'ont pas d'anémie. 90% des chiens ayant une anémie importante ont un test de Coombs positif (Furlanello *et al.*, 2005).

Des complications dues à des rhabdomyolyses ont été décrites récemment chez deux chiens ; ils présentaient un sérum hémolytique, des urines couleur caramel, une augmentation

des créatines kinases, une insuffisance rénale, des douleurs musculaires. L'analyse histologique a révélé une nécrose musculaire ainsi qu'une hémorragie (Böhm *et al.*, 2006).

Cette sous-espèce est aussi fréquemment responsable de **coagulation intra vasculaire disséminée** (Furlanello *et al.*, 2005).

III.2.1.2. Babesia canis canis

B. canis canis sévit dans les régions tempérées. On la retrouve surtout en Europe et en Asie. La séroprévalence en France est de 20 à 30% mais elle peut être plus importante dans les zones endémiques. Ainsi, dans les zones enzootiques de France, sur 500 chiens testés, 85% ont des anticorps contre *Babesia* mais seul 14% présentent des signes cliniques et la mortalité n'est que de 1,5%. Les causes de mortalité sont des insuffisances rénales et hépatiques (Boozer et Macintire, 2003).

Cette sous-espèce engendre une **parasitémie limitée** (souvent autour de 1%) et des signes cliniques associés à une congestion des organes (Caccio *et al.*, 2002).

Les symptômes sont variés, on peut observer une léthargie, une anorexie, de la fièvre, une anémie (Furlanello *et al.*, 2005).

III.2.1.3. Babesia canis vogeli

B. canis vogeli sévit surtout aux Etats Unis et dans les régions tropicales et subtropicales. On peut aussi la trouver en Afrique et en Europe. Elle a été décrite pour la première fois en 1934, en Floride, chez des Greyhounds. Les signes cliniques généraux sont les mêmes que ceux de *B. canis canis*. C'est la souche la moins pathogène.

Elle cause une **anémie** chez les jeunes. Des dépistages chez les greyhounds montrent une prévalence plus importante de piroplasmoses qui semble être due à une sensibilité génétique et à une exposition à un grand nombre de tiques. La prévalence d'infection est d'environ 13% aux Etats-Unis (Boozer et Macintire, 2003).

Il n'existe pas de protection croisée entre les trois sous espèces de *B. canis*.

.III.2.2.Pathogénie où domine l'hémolyse

III.2.2.1.*Babesia gibsoni*

B. gibsoni a été découverte en 1910 en Inde. Elle est présente de façon endémique en Asie, aux Etats-Unis, au nord et au sud de l'Afrique, au Brésil, en Australie et très rarement en Europe (sa présence a été confirmée en Italie, en Allemagne et en Espagne). Deux souches ont récemment été isolées *B. gibsoni asia* et *B. gibsoni california*.

Elle est responsable de fièvre, **d'anémie progressive**, **d'hémoglobinurie** ainsi qu'une **hépatomégalie et une splénomégalie** marquée. Une **thrombocytopénie** est aussi fréquemment rapportée (Boozer et Macintire, 2003).

La parasitémie excède rarement les 10%, cependant les animaux souffrent fréquemment d'anémie sévère (Boozer et Macintire, 2003). Les symptômes sont d'autant plus intenses que l'hôte est immunodéprimé.

L'infection est le plus souvent chronique. Des formes aiguës ont été décrites en de rares occasions aux Etats-Unis chez des chiots qui se seraient infectés in utero (Boozer et Macintire, 2005).

Parmi 40 cas décrits en Italie, 55% des chiens présentent des signes cutanés ou muqueux (alopécie, pyodermite, pododermatite, conjonctivite, kératite) qui disparaissent en même temps que les symptômes classiques après un traitement spécifique.

III.2.2.2.*Theileria annae*

T. annae a été décrite pour la première fois en 2000 par Zhaler *et al.*. Elle a été isolée chez d'un chien vivant en Allemagne, dans une zone indemne de piroplamose et qui s'était infecté lors d'un séjour dans les Pyrénées espagnoles en 1994 (Zhaler *et al.*, 2000). Ce piroplasma récemment découvert, semble être responsable de piroplasmose endémique dans le nord-ouest de l'Espagne. Son réservoir est le renard (Criado-Fornelio 2003). Pour le moment, elle n'a été isolée qu'en Europe.

T. annae, comme les autres piroplasmes, est responsable d'une faiblesse générale (dans 79% des cas), d'une hyperthermie, d'une hémoglobinurie (dans 42% des cas) et d'une anémie. Certains chiens présentent aussi une tachypnée, une splénomégalie et plus rarement

des symptômes digestifs, génito-urinaires, musculo-squelettiques, cutanés et neurologiques (Guittan *et al.*, 2003).

Ce piroplasma est responsable d'une **forte anémie hémolytique régénérative** qui cause une glomérulonéphrite, une néphrite interstitielle ou une tubulopathie. Une réaction auto immune est responsable de la formation d'immuns complexes qui se déposent dans les glomérules rénaux et augmente la destruction de ceux-ci. Ces mécanismes sont à l'origine **d'une urémie** (qui peut atteindre 3g/L chez ces chiens) et une mauvaise concentration de l'urine. De plus ce parasite engendre une **thrombocytopénie** et une réaction inflammatoire intense (Camacho *et al.*, 2005, Garcia, 2006).

Une étude, publiée 2004, réalisée par Camacho *et al.* sur 58 chiens vivants dans le Nord-est de l'Espagne et infectés par *T. annae*, montre que l'augmentation de l'urémie et de la créatininémie sanguine a une valeur pronostique. En effet, un chien présentant des valeurs élevées d'urée et de créatinine sanguine une semaine après le diagnostic de la piroplasmose, a 20 fois plus de chance de mourir qu'un chien infecté ayant des valeurs normales (Camacho *et al.*, 2004).

III.3.Pronostic

Le pronostic dépend **d'éléments anamnestiques** : le « passé piroplasmique », l'existence d'affections intercurrentes (rénales, hépatiques...)

Le pronostic dépend aussi de la **forme clinique** de la maladie et du **type de piroplasma**.

- Si la piroplasmose est « classique » c'est-à-dire que les manifestations cliniques sont imputables à l'hémolyse, que l'expression clinique est modérée ou sévère, que l'évolution est aiguë, le pronostic est bon, si le traitement est entrepris rapidement.

- Par contre, il peut devenir très sombre lorsque toutes les manifestations cliniques ne peuvent être causées uniquement par l'hémolyse, ou que l'animal présente un syndrome de pseudo-septicémie avec une inflammation générale et une défaillance multiviscérale (choc, hypotension, hypoglycémie, acidose métabolique...).

L'apparition d'une insuffisance rénale assombrit le pronostic.

Une étude réalisée sur des chiens souffrant de piroplasmose due à *B. canis rossi* montre que l'hypoglycémie et l'hyperlactatémie sont aussi des indicateurs péjoratifs du pronostic à la différence de l'hématocrite (Nel *et al.*, 2004).

III.4.Méthodes de lutte

.III.4.1.Traitement

Les guérisons spontanées sont exceptionnelles et un traitement rapide doit être instauré.

La thérapeutique comprend deux volets :

- Un traitement étiologique destiné à éliminer le parasite
- Un traitement symptomatique afin de soutenir l'état général de l'animal.

III.4.1.1.Traitement étiologique

De nombreuses molécules ont été utilisées : l'aceturate de diminazène, l'imidocarbe, le quinuronium sulfate, le bleu trypan, la pentamidine, la phénamidine...

L'imidocarbe est la seule molécule piroplasmicide disponible en France. Elle peut être associée à des antibiotiques.

❑ L'imidocarbe

L'imidocarbe appartient à la famille des diamidines aromatiques. Cette molécule est dérivée de l'imidazole, sa dénomination chimique est la N,N'bis[3-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)phenyl]urée.

C'est un puissant **inhibiteur de cholestérase**. Il agirait surtout en se combinant avec les acides nucléiques de l'ADN des protozoaires sensibles, ce qui conduit au déroulement et à la dénaturation de l'ADN. Cette lésion irréversible de l'ADN inhiberait sa réparation et sa réplication, et conduirait à la mort des protozoaires. Il agirait aussi en inhibant la glycolyse aérobie des protozoaires sensibles (Pouliquen, 2005).

Cette molécule est métabolisée lentement dans l'organisme par le foie et le rein et est donc rémanente. Sa biotransformation est essentiellement hépatique.

Elle peut entraîner des effets secondaires : salivation, larmolement, trémulations musculaires, tachycardie, dyspnée et diarrhées peuvent apparaître 10 minutes après injection. Une prémédication avec de l'atropine suffit généralement à prévenir ces effets (Boozer et Macintire, 2003). Exceptionnellement (dans moins de 1% des cas), elle peut induire des accidents immunoallergiques graves avec des localisations cutanées (dermite séborrhéique périvasculaire superficielle) et parfois rénales (néphrite interstitielle). En raison de sa métabolisation, il convient d'utiliser avec précaution cette molécule chez les animaux souffrant d'insuffisance hépatique ou rénale.

L'imidocarbe est commercialisée sous le nom de Carbésia N.D. Elle est disponible sous forme d'une solution injectable contenant 8,5% de dipronate d'imidocarbe.

Chez le chien, elle s'utilise par voie sous cutanée ou intra musculaire. L'injection par voie sous cutanée est souvent douloureuse, il est préférable d'utiliser la voie intra musculaire.

Les doses préconisées pour une action préventive sont de 6 mg/kg soit 0,5 mL de Carbésia N.D. pour 10kg de poids vif. La durée de chimioprévention est en moyenne de 4 à 6 semaines (Perchereau, 1986).

Pour obtenir une action curative, il faut injecter 3 mg/kg soit 0,25 mL de Carbésia N.D pour 10 kg de poids vif (Perchereau, 1986).

Une injection unique suffit généralement à éliminer *B. canis vogeli* et *B. canis canis*. Par contre, l'efficacité du traitement contre *B. gibsoni* et *B. canis rossi* est variable. Deux injections à 15 jours d'intervalle sont recommandées pour les éliminer. *T. annae*, est une espèce récemment découverte contre laquelle peu d'essais ont été réalisés, sa sensibilité au traitement est donc peu connue (Birkenheuer, 2003).

❑ L'association de molécules

L'échec de l'utilisation de l'imidocarbe pour éliminer certaines *B. gibsoni* a conduit à la recherche d'autres traitements.

Une étude récente effectuée par Suziki *et al.* en 2006 sur quatre chiens, démontre l'efficacité de l'association de la **clindamycine à 25 mg/kg *per os* deux fois par jour**, avec le **métronidazole à 15 mg/kg *per os* deux fois par jour** et la **doxocycline à 5mg/kg *per os* deux fois par jour** (Suziki *et al.*, 2006).

Les auteurs ont suivi l'évolution clinique des animaux, leur taux de plaquettes, de protéine C et ont recherché par PCR la présence du parasite dans le sang. Trois chiens ont été guéris, le parasite est resté détectable par PCR chez un de ces chiens, et un chien est mort. Néanmoins, les résultats même s'ils sont encourageants, doivent être confirmés car le nombre de chiens testés est faible, il n'y a aucun chien témoin dans cette étude, et aucun suivi n'a été effectué pour détecter les éventuelles rechutes (Suziki *et al.*, 2006).

D'autres essais thérapeutiques sont aussi réalisés sur les animaux contaminés par *B. gibsoni*, l'équipe de Matsuu *et al.* en 2006 a testé l'efficacité de l'atoquavone qui est une molécule utilisée habituellement pour lutter contre le paludisme. Elle agit en inhibant le cytochrome bc1 grâce à une action compétitive avec la coenzyme Q. L'analyse de la séquence ADN du cytochrome b a montré que les parasites des animaux traités ont acquis des mutations afin de résister au traitement. Cet article montre la difficulté d'éradiquer ce parasite (Matsuu *et al.*, 2006).

III.4.1.2.Le traitement symptomatique

Il consiste à soutenir les différents organes afin de lutter contre l'insuffisance rénale, hépatique, le choc ...

.III.4.2.Rechute

Une rechute est possible à partir de quelques parasites persistants. Ce phénomène est de plus en plus souvent décrit. Les petites *Babesia* sont beaucoup plus résistantes au traitement, il y a plus souvent d'infectés chroniques dues à des petites *Babesia* suite au traitement, que dus à des grandes formes (Boozer et Macintire, 2003).

Lors de rechute, on observe un **syndrome hémolytique** (le plus souvent non compliqué) une dizaine de jours après le premier accès bien traité, et quasi identique à celui-

ci, en l'absence de réinfection par les tiques. Il est même possible qu'une seconde rechute se produise.

Ce phénomène ne repose pas sur l'apparition avérée de souches chimio-résistantes. Lors de rechute apparente, un changement de protocole thérapeutique ne semble pas efficace. Ces cas révéleraient une incompétence particulière du système immunitaire à l'encontre des piroplasmes. L'hypothèse de phénomènes de séquestration des parasites dans des organes profonds afin d'échapper aux molécules protosticides est aussi évoquée (Bourdoiseau, 2005).

.III.4.3.Prophylaxie

III.4.3.1.Prévention des morsures de tiques

L'étape capitale de la prophylaxie est la lutte contre les tiques.

Elle passe par une **inspection minutieuse de l'animal** par les propriétaires et le retrait des tiques le plus tôt possible. En effet, celles-ci ne transmettent les sporozoïtes qu'après 2 à 3 jours de repas sanguin.

Pour éviter tout contact entre les tiques et l'animal, il est aussi conseillé de nettoyer les locaux pour éliminer les tiques de chenil *Rhipicephalus sanguineus*.

Il existe aussi de nombreux acaricides qui peuvent être appliqués sur l'animal afin d'éviter toute fixation de tiques. Plusieurs formes galéniques sont proposées :

- collier à base de deltaméthrine, de fluméthrine ou d'amitraz
- solution externe à base d'amitraz, fipronil, perméthrine
- de spot-on par effet de surface (perméthrine, fipronil)

III.4.3.2.Prévention de l'infection par les piroplasmes

□ Chimioprévention

L'administration d'imidocarbe est proposée comme méthode de chimioprévention. Les quelques études effectuées ont montré une certaine divergence des résultats. La posologie proposée est de 3 à 6 mg/kg et est supposée assurer une protection de 4 à 6 semaines.

□ Vaccination

La vaccination atténue de manière considérable la gravité des scores cliniques et la sévérité de l'anémie. Elle a peu ou pas d'action sur la parasitémie, en effet, elle ne peut pas empêcher qu'une tique infestante injecte les parasites dans le sang du chien vacciné (Vandaele, 2007).

La primovaccination se fait en deux injections à trois semaines d'intervalle. L'immunité apparaît trois semaines après la deuxième injection et dure 6 mois environ. La vaccination de la chienne gestante est contre-indiquée. La primovaccination ne peut être réalisée qu'après l'âge de 6 mois.

Les vaccins sont composés d'antigènes parasitaires solubles, ces antigènes externes sont libérés lors de la lyse de l'hématie et ont un rôle crucial dans la pathogénie des piroplasmoses.

Deux vaccins sont actuellement disponibles en France.

- **Pirodog N.D.**

C'est le premier vaccin qui a été proposé en France ; il a été mis sur le marché en 1985. C'est un **vaccin inactivé, monovalent**, constitué d'antigènes parasitaires solubles obtenus à partir de la culture de la souche de *B. canis canis* type Robin/Villeubane.

Il est supposé présenter 89% d'efficacité contre *B. canis canis* mais ne permet aucune protection croisée contre les autres souches, ce qui engendre des échecs de vaccination.

- Nobivac piro N.D.

Ce vaccin est **inactivé et bivalent**, il associe des antigènes parasitaires solubles de *B. canis rossi* et *B. canis canis* type A ce qui offre une protection hétérologue contre *B. canis*.

Les études réalisées par le laboratoire concluent que 97% des chiens vaccinés dépassent le seuil de protection vaccinal (seuil défini par un marqueur sérologique corrélé à la valeur de l'hématocrite) et 95% des chiens vaccinés vivant en zone d'endémie entre juillet 2005 et août 2006 n'ont pas présenté de signes cliniques de piroplasmose.

□ Autres mesures

De façon plus anecdotique, il faut retirer des donneurs de sang les chiens ayant une PCR ou une sérologie positive contre *Babesia* ou *Theileria*.

Partie 2 : Diagnostic des piroplasmoses canines

IV.Diagnostic épidémiologique

Le diagnostic de la piroplasmose est plus ou moins simple selon l'expression clinique, la sensibilisation du praticien et les commémoratifs. La sensibilisation des praticiens à la maladie est fortement liée à sa prévalence dans la zone considérée.

La suspicion repose essentiellement sur l'anamnèse et sur les données épidémiologiques :

IV.1.Anamnèse

- ☐ Séjours de l'animal en zone à risque quelques jours ou semaines auparavant (promenade en forêt, animal qui chasse...),
- ☐ Antécédents éventuels de piroplasmose (rechutes),
- ☐ Présence récente de tiques sur l'animal,
- ☐ Habitat du chien (chenil...),
- ☐ Race du chien, activité.

IV.2.Données épidémiologiques

- ☐ Région : zone d'enzootie.
- ☐ Saison : en relation avec la présence de tiques.

V. Examen clinique : recherche de signes cliniques de piroplasmose

Aucun signe clinique n'est pathognomonique, le tableau clinique oriente juste le diagnostic qui doit ensuite être confirmé.

V.1.État général de l'animal

La **léthargie**, l'**abattement**, l'**anorexie** sont souvent des signes d'appel de la piroplasmose.

L'**anorexie** est observée chez 80% des chiens infectés (Pagès et Trouillet, 1986), la dépression, et l'abattement sont retrouvés chez 78% des malades (Pagès et Trouillet, 1986). Néanmoins, 20% des malades gardent un habitus et un appétit normaux. L'animal peut aussi présenter un syndrome algique (myosite surtout) ou une parésie du train arrière.

V.2.Température corporelle

L'hyperthermie est fréquente mais inconstante.

Selon Pagès, 83,6% des chiens ayant un frottis positif ont plus de 39°C (Pagès et Trouillet, 1986). Selon une étude réalisée par Meynard et Goudichard en 1974, l'hyperthermie initiale est constante (100% dans les premières 24 heures) mais relativement fugace et d'amenuise progressivement vers les 3^{ème} et 4^{ème} jours, on la rencontre de moins en moins fréquemment à partir du 5^{ème} jour (Meynard et Goudichard, 1974).

L'hyperthermie ne peut donc être recherchée que dans les premiers jours de la maladie, par la suite elle est de plus en plus inconstante.

V.3.Examen des muqueuses oculaires, vulvaires, buccales

L'**ictère** classiquement décrit est peu fréquent (moins de 5% des cas) Il est de couleur jaune franc. La rareté de l'ictère s'explique par la faible hémolyse.

Les muqueuses peuvent aussi être **pâles**. Ce signe clinique n'est retrouvé que dans 25% des cas (Pagès et Trouillet, 1986). Une **congestion des muqueuses** est aussi rapportée dans 10% des cas.

V.4.Palpation abdominale

La splénomégalie est un signe clinique constant et très précoce.

Elle est décelable 24 heures post infection sur 40% des malades, et s'accuse dans les jours qui suivent (60% des malades à 48 heures), puis elle se stabilise à partir du cinquième jour. Elle est plus fréquente et plus importante chez les jeunes sujets (Pagès et Trouillet, 1986). Elle est difficile à mettre en évidence.

V.5.Examen des urines

On peut classer la couleur des urines en deux catégories : normales et sombres (hémoglobinurie).

Un malade sur deux à des urines claires (Pagès et Trouillet, 1986). Ces signes sont souvent considérés comme caractéristique de la maladie mais sont très inconstants.

V.6.Autres signes cliniques

Tous les appareils peuvent être lésés, donnant à la piroplasmose une expression polymorphe ce qui rend le diagnostic clinique difficile.

.V.6.1.Troubles digestifs

La piroplasmose peut engendrer des **vomissements, des selles de couleur mordorée** (50%), **glaireuses** (15%) **voire sanglantes** (5%) (Pagès et Trouillet, 1986).

.V.6.2.Troubles cutanés

Les troubles les plus fréquemment rencontrés sont des **oedèmes**. Les chiens présentent un épaissement du derme de l'oreille (Meynard et Goudichard, 1974), du scrotum, des phénomènes urticariens avec œdème de la face, de la conjonctivite bulbaire (Robin, 1974).

Des lésions de **vascularites**, parfois de **nécroses** des extrémités des doigts, de la queue, des oreilles, des hémorragies, ainsi que du purpura ont aussi été rapportés.

.V.6.3.Troubles cardio-pulmonaires

Ils se manifestent par une **toux, un syndrome de détresse respiratoire**, ainsi que **des troubles du rythme**. Ces symptômes sont peu fréquents chez le chien mais constituent les principales causes de mortalité (Koffi, 1999).

.V.6.4.Troubles nerveux et locomoteurs

Les animaux peuvent présenter une **parésie, une paralysie des postérieurs, un nystagmus, de l'ataxie, des convulsions, des boiteries, des douleurs articulaires ou cervicales** (Bourdeau et Guelfi, 1995).

.V.6.5.Troubles hémorragiques

Les signes hémorragiques sont présents sur environ 5% des malades (Pagès et Trouillet 1984). Ils se manifestent par des **hémorragies rétinienne, intra articulaires, gingivales, des othématomes, des hématomes cutanés ou du purpura**. Les hémorragies rétinienne, observées dans 18 à 30% des cas graves, constituent un élément péjoratif du pronostic.

Certains troubles traduisant des lésions vasculaires (troubles cérébraux et rétinienne) sont beaucoup plus fréquents chez les Colleys (Pagès et Trouillet, 1986).

.V.6.6.Conclusion de l'examen clinique

Les symptômes de la piroplasmose sont des symptômes peu spécifiques et inconstants. L'hyperthermie paraît la plus évocatrice mais elle est fugace. Le diagnostic de la piroplasmose nécessite donc des examens complémentaires.

VI.Examens biochimiques : recherche de complications

VI.1.Complications rénales

L'insuffisance rénale de la piroplasmose a dans la plupart des cas la même origine : il s'agit d'une insuffisance rénale aiguë oligoanurique ou anurique induite par une **hémoglobinurie massive et l'hypoperfusion rénale**. Une réaction immune peut aussi être responsable de la **formation d'immuns complexes** qui se déposent dans les glomérules rénaux et augmente la destruction de ceux-ci (Pagès, 1999).

.VI.1.1.Bandelette urinaire

La **recherche de pigments biliaires** est positive sur moins de la moitié des malades, associée ou non à une hémoglobinurie. L'**hémoglobinurie** est rencontrée lors d'hémolyse intravasculaire massive. Un sédiment urinaire est fréquent dans les urines de couleur sombre. Il est alors constitué de cristaux de bilirubine, de cylindre hématique, de leucocytes et d'hématie.

Le parasite peut engendrer des lésions rénales comme une glomérulonéphrite, qui sera caractérisée par une **protéinurie marquée**, fugace (moins de 5 jours) et qui disparaît après l'injection du piroplasmicide. Moins de 1% des chiens ont une **glycosurie** (Pagès, 1999), par contre une protéinurie est fréquemment rencontrée.

.VI.1.2.Dosage de l'urémie et de la créatininémie sanguine

Lors d'insuffisance rénale, on note une augmentation de l'urémie ainsi que de la créatininémie sanguine.

Une étude, publiée 2004, réalisée par Camacho *et al.* sur 58 chiens vivants dans le Nord est de l'Espagne et infectés par *T. annae*, **montre que l'augmentation de l'urémie et de la créatininémie sanguine a une valeur pronostique**. En effet, un chien présentant des

valeurs élevées d'urée et de créatinine sanguine une semaine après le diagnostic de la piroplasmose, a 20 fois plus de chance de mourir qu'un chien infecté ayant des valeurs normales (Camacho *et al.*, 2004).

.VI.1.3.Dosage de la protéine C réactive

La protéine C réactive augmente de façon significative lors d'une infection récente par le piroplasma et diminue lorsque le traitement est efficace. Cette protéine sanguine peut être un marqueur intéressant pour suivre l'efficacité du traitement piroplasmicide (Matijatko *et al.*, 2007).

VI.2.Complications hépatiques

L'ictère de la piroplasmose est un ictère hémolytique qui peut évoluer plus ou moins rapidement vers un ictère hépatique. Sa fréquence est relativement faible, inférieure à 10%. La cytolyse et la cholestase modérées au départ peuvent s'accroître brutalement après installation d'un ictère hépatique qui peut évoluer vers une insuffisance hépatocellulaire sévère (Pagès et Trouillet, 1986).

VII.Examens hématologiques

VII.1.Numération formule

.VII.1.1.Erythrocytes

Les valeurs de l'hématocrite, de l'hémoglobine et du nombre d'hématies sont en moyenne inférieures aux valeurs couramment admises, toutefois seuls moins de 25% des malades ont moins de 10g/L d'hémoglobine et 5% moins de 5g/L.

L'anémie est **régénérative, normochrome, et normocytaire**. Elle est fréquente mais non constante, dans une étude réalisée par Furlanello *et al.* en 2005, le pourcentage de chiens anémiés parmi les chiens malades est de 74% (Furlanello *et al.*, 2005).

.VII.1.2.Plaquettes

La thrombocytopénie est **fréquente** (plus de 90% des malades ont moins de 100 000 plaquettes par microlitre), **massive** (plus de 80% des malades ont moins de 50 000 plaquettes par μ L) et **transitoire** (retour à la normale une semaine après le traitement). Elle est d'origine **périphérique**, la moelle osseuse reste riche en mégacaryocytes (Pagès et Trouillet, 1984).

Le suivi du taux de plaquettes lors du traitement est un bon marqueur de l'efficacité du traitement (Suzuki *et al.*, 2007).

.VII.1.3.Leucocytes

Le taux de leucocytes est **très variable** : on peut observer une leucopénie suivie d'une leucocytose ou inversement (Pagès et Trouillet, 1986).

Les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes ont des valeurs voisines abaissées par rapport aux valeurs usuelles, mais avec une plus grande dispersion. Une étude récente montre qu'il existe une éosinopénie et une lymphopénie précoces qui disparaissent avec le temps (Guelfi et Candebat, 1998).

VII.2.Examen direct du parasite

Cette méthode repose sur l'observation au microscope optique de piroplasmes intra-érythrocytaires. On réalise pour cela un frottis que l'on colore grâce à une coloration de type MGG (May Grünwald Giemsa).

L'hémogramme se réalise en quatre temps : le prélèvement, l'étalement, la coloration et enfin l'examen au microscope.

.VII.2.1.Réalisation du frottis sanguin

❑ Le prélèvement

Le frottis sanguin se réalise à partir de **sang périphérique**, il se prélève de préférence sur la face interne du pavillon de l'oreille. On prélève la première goutte de sang recueillie après scarification ou ponction des capillaires superficiels du pavillon auriculaire. Cette ponction est réalisée avec un vaccinostyle ou une aiguille hypodermique. La goutte obtenue est directement déposée sur la lame.

On choisit de prélever dans les capillaires périphériques car les hématies parasitées sont moins souples et ont tendance à rester coincées dans les capillaires périphériques. Il est préférable de récolter la première goutte qui apparaît après la scarification car elle est plus riche en piroplasmes (Robin, 1974).

❑ L'étalement sanguin

La goutte de sang récoltée se trouve à l'extrémité de la lame. On place une lame rodée devant la goutte avec un angle de 45°, la goutte s'étale alors le long du bord de la lame, on la déplace ensuite d'un mouvement régulier vers l'avant en la glissant sur la lame porte objet. Cette partie est la plus délicate, c'est de l'étalement que dépend la qualité de l'hémogramme.

On sèche enfin le frottis à l'air par agitation. Un frottis correctement effectué est contenu entièrement sur la lame et sa queue (extrémité distale) n'atteint pas l'extrémité de la lame. Le frottis peut être lu à ce moment-là et mettre en évidence des parasites.

❑ La coloration

Différentes techniques de coloration peuvent être employées pour mettre en évidence le parasite sur l'étalement sanguin.

- coloration de May-Grünwald Giemsa. Tout d'abord on recouvre le frottis avec le colorant May-Grünwald et on le laisse agir pendant 5 minutes. Ensuite on jette le colorant et on recouvre la lame d'une solution de Giemsa diluée au dixième dans de l'eau pour préparation injectable préparée extemporanément, pendant 5 à 10 minutes. On jette enfin le colorant puis on rince la lame à l'eau du robinet pendant quelques secondes. On frotte le dessous de la lame avec un linge pour retirer le dépôt de colorant et on sèche la lame à l'air tiède. Cette coloration permet de révéler au sein des hématies rouge pâle les piroplasmes au cytoplasme bleu violacé et un noyau rouge sombre.
- Coloration de type RAL. Tout d'abord, il faut fixer le frottis en le flambant à l'alcool ou fixer à la chaleur douce. Ensuite, on laisse refroidir la lame, puis on recouvre le frottis avec de la fuchsine Ziehl. On le laisse en contact 10 minutes en ajoutant de temps en temps de la fuchsine pour éviter la dessiccation. On lave ensuite puis on recouvre la frottis avec le colorant d'Armand pendant 1 à 2 minutes. On lave enfin puis on sèche le frottis.

❑ Examen au microscope

La lecture doit être faite de façon minutieuse et sur l'ensemble de la lame grâce à l'objectif à immersion, les globules rouges parasités (plus lourds) sont surtout présents sur les bords et dans la partie distale du frottis.

.VII.2.2.Interprétation du frottis

La lecture du frottis doit se faire durant **5 à 10 minutes** si on n'observe pas de piroplasmes. Les parasites sont surtout observés en bout de frottis ou sur les bords (car les hématies qui les contiennent sont plus lourdes).

L'observation d'un piroplasma quelle que soit la forme a une valeur diagnostique mais la non observation de piroplasma sur le frottis ne permet pas d'exclure de façon formelle une piroplasmose.

Il est possible de distinguer des espèces de piroplasmes différentes grâce à leur taille : *B. canis* est un piroplasma de grande taille, qui mesure plus de la moitié du rayon de l'hématie tandis que *B. gibsoni* et *T. annae*, sont de petite taille (inférieure au rayon de l'hématie).

Pour *Babesia canis*, plusieurs éléments morphologiques peuvent être observés dans les hématies :

- une forme typique en poire ou en forme de goutte c'est-à-dire avec une extrémité amincie, effilée et une autre arrondie. Cette forme mesure entre 4 et 5 µm de longueur ce qui est supérieur au diamètre d'une hématie. Elle n'est pas toujours observée au cours de la maladie.
- une forme « bigéminée » constituée de deux éléments piriformes réunis par leur extrémité antérieure et formant un angle aigu. Cette forme est due au processus de schizogonie qui est une division binaire du protozoaire. Il peut y avoir plusieurs formes bigéminées au sein d'une hématie.
- des formes rondes, annulaires, amiboïdes, au centre de l'hématie.

Ces éléments, quelle que soit leur forme, présentent un centre vacuolaire de grande taille et une périphérie dense constituée de chromatine qui permet après la coloration de voir un centre clair et une périphérie fortement colorée.

.VII.2.3.Intérêts et limites de l'examen direct

Intérêts

- ☐ Cette méthode est **rapide et peu coûteuse**,
- ☐ Elle est **simple et spécifique**,
- ☐ L'observation du frottis apporte de nombreuses informations sur les cellules de la lignée blanche, sur l'anémie et peuvent orienter la thérapeutique et le pronostic,

- ❑ Elle permet la mise en évidence d'autres parasites (hémobartonéllose ou rickettsioses par exemple).

Inconvénients

- ❑ Manque de **sensibilité**

Les **faux négatifs** qui sont dus d'une part à un facteur humain (manque d'expérience de la part de celui qui analyse le frottis ou encore analyse trop rapide de celui) et d'autre part, à un manque de richesse des prélèvements. On estime que l'analyse directe permet de détecter le parasite si la parasitémie se situe au dessus de **0.001%** (Sobczyk *et al.*, 2005).

De plus, la quantité de parasites dans l'échantillon diminue si :

- le prélèvement est réalisé à partir de sang profond et non périphérique (peu riche en hématies parasitées),
- l'animal est infecté chronique (dans ce cas la réponse immunitaire limite le nombre de parasites).

Pour augmenter la sensibilité de cette technique, il est possible **d'enrichir le frottis par centrifugation**. Cette technique a été mise au point en 1988 par Spielma *et al.* pour détecter des *Plasmodium* dans des échantillons de sang humains (Normand et Chabane, 2005). Il existe plusieurs méthodes.

La première est de prélever du sang veineux dans un tube à EDTA et de le laisser sédimenter quelques minutes. On recueille la totalité du surnageant qu'on centrifuge à 2500 tours/min pendant 5 minutes. On étale ensuite une goutte du culot obtenu sur une lame puis on colore au May Grünwald Giemsa. On obtient ainsi un frottis riche en plaquettes, en globules blancs, en réticulocytes et en globules rouges parasités (Hugnet *et al.*, 2000).

On peut aussi enrichir le prélèvement, en plaçant le surnageant dans un tube à hématocrite que l'on centrifuge (centrifugeuse de paillasse 1500 tours par minutes) pendant 3 minutes. Cette centrifugation permet d'une part de mesurer le taux d'hématocrite (dont les valeurs usuelles sont de 38 à 50 % et qui peuvent s'effondrer jusque 20% dans le cas d'une piroplasmose) et d'autre part de concentrer les hématies en une couche de 1 à 3 mm située

entre le plasma et le culot. Le tube est alors brisé à 2-3 mm en arrière de l'interface du côté de l'amas cellulaire, la fine couche d'hématie ainsi isolée est alors projetée sur une lame à l'aide d'une pipette et est utilisée pour réaliser le frottis (Hugnet *et al.*, 2000).

Cette technique permet de **multiplier par 5 environ** le nombre d'hématies parasitées sur un frottis.

Les limites d'utilisation de cette technique peuvent être liées soit à l'animal (hématocrite inférieure à 10% ne permet pas de casser correctement le tube à l'endroit voulu) soit au lecteur du frottis (mauvaise identification des parasites ou artéfacts).

❑ Manque de **spécificité**

Il existe des **faux positifs** par exemple, il est possible de confondre le parasite avec d'autres **agents intracellulaires** (comme les bactéries du genre *Ehrlichia* qui est un parasite des monocytes et des polynucléaires ou *Mycoplasma canis*) ou tout simplement de le confondre avec des **artéfacts de coloration** (dus à des dépôts de colorants ou à la superposition d'une plaquette et d'une hématie).

❑ Cette méthode **ne permet pas de faire la distinction entre les sous-espèces** de piroplasmes, elle permet juste de distinguer les grandes formes des petites formes de piroplasmes.

VIII.Examens immunologiques

VIII.1.Immunité lors de babésiose

La défense de l'organisme contre les piroplasmes est permise par une immunité à médiation humorale qui fonctionne en synergie avec une immunité à médiation cellulaire.

.VIII.1.1.Immunité à médiation humorale

L'immunité à médiation humorale fait essentiellement intervenir le **complément** et les **anticorps**.

Une fois inoculés par la tiques, les sporozoïtes se retrouvent libres dans le plasma pendant une courte période ce qui permet la production d'immunoglobuline G (IgG) puis d'IgM, par les lymphocytes B, afin de neutraliser les sporozoïtes avant qu'ils ne rentrent dans les hématies (Homer *et al.*, 2000).

Dès 5 jours post infestation, on détecte des traces d'anticorps dans le sérum. La séroconversion commence au bout de deux semaines, mais il faut au moins attendre trois semaines avant d'avoir un taux d'anticorps important et éventuellement protecteur (Moreau *et al.* 1986). Les anticorps disparaissent 5 à 8 mois après l'infection (Boozer et Macintire, 2003).

Le mode d'action des anticorps est sans doute multiple, selon Moreau *et al.*, ils pourraient, se lier au ligand du mérozoïte pour empêcher sa pénétration dans l'hématie, ou se fixer au récepteur du globule rouge dans le même but. Ils pourraient aussi agglutiner les mérozoïtes libres pour permettre leur lyse par le complément, et participer aux réactions de phagocytose en permettant leur opsonisation par les macrophages (Moreau *et al.*, 1986).

L'immunité à médiation humorale est aussi permise par le complément. L'activation du complément est responsable de la formation de nombreux produits de clivage, biologiquement actifs et capables d'interagir avec de nombreux types cellulaires par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques (Dorchies, 1974).

.VIII.1.2.Immunité à médiation cellulaire

Il y a intervention de macrophages qui produisent des facteurs TNF alpha et du NO et de cellules NK qui produisent des interférons gamma. Cependant, on ne sait pas clairement comment ces facteurs agissent (Homer *et al.*, 2000).

La réaction immunitaire à médiation cellulaire fait aussi intervenir des lymphocytes T dont l'activité dépend de la reconnaissance de l'antigène qui leur est présenté par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité.

Leur activation entraîne la sélection de différents types cellulaires ayant trois principales fonctions : une fonction régulatrice grâce aux lymphocytes auxiliaires et suppresseurs, une fonction effectrice grâce aux lymphocytes T cytotoxique, et enfin une fonction mémoire grâce aux lymphocytes T mémoire.

L'augmentation du nombre de CD4⁺ (lymphocytes T auxiliaires) permet la production des interférons gamma qui sembleraient être directement toxiques pour les parasites intracellulaires (Homer *et al.*, 2000).

Les méthodes de diagnostic reposent sur la détection d'anticorps sériques. Elles existent depuis 1972 et comprennent le test de précipitation en gélose, le test de fixation du complément, le test d'immunofluorescence indirecte et les tests ELISA. Cependant en routine, pour diagnostiquer la piroplasmose canine, seuls sont utilisés les tests d'immunofluorescence indirecte et l'ELISA.

VIII.2.Immunofluorescence indirecte (I.F.I)

.VIII.2.1.Principe

Le principe de cette méthode est de rendre visible un complexe anticorps- antigène fixé sur une lame grâce à un couplage avec un conjugué fluorescent dirigés contre les anticorps de l'espèce animale.

.VIII.2.2.Réalisation

On utilise des antigènes figurés qui peuvent être présentés par le parasite lui-même ou par des coupes histologiques contenant le parasite. Pour *Babesia* ce sont des étalements sur lame de verre de sang provenant d'animaux parasités expérimentalement. Ces lames de microscope sont couvertes de téflon et présentent 12 puits.

On cherche à détecter des IgG anti-*Babesia* dans le sérum du patient. Des dilutions de ce sérum sont réalisées et chaque dilution est placée dans un puits.

Dans un premier temps, on met en contact l'anticorps (sérum du chien suspect) et l'antigène (lame de verre avec sang de chien infecté). On laisse ensuite incuber pendant 30 à 60 minutes puis on effectue un lavage pour éliminer les anticorps non fixés. Ensuite on ajoute les antiglobulines marquées par le fluorochrome et un contre colorant (du bleu Evans). Les conjugués fluorescents sont des conjugués d'antiglobuline de diverses espèces dirigés contre les anticorps canins (Lamour, 1995).

On effectue enfin un deuxième lavage pour éliminer les antiglobulines non fixées.

La lecture se fait sous microscope à fluorescence.

.VIII.2.3.Interprétation

Réaction positive

On observe une fluorescence spécifique jaune verte dont l'intensité est exprimée en nombre de croix. Elle témoigne de la présence et de la fixation de l'anticorps. Plus l'intensité est importante, plus les anticorps sont nombreux.

Réaction négative

On n'observe pas de fluorescence.

La présence de fluorescence pour la dernière des dilutions en série à être positive indique le « titre » en anticorps.

La réaction est assez souvent difficile à interpréter car il existe des fluorescences non spécifiques dues à des impuretés dans le sérum. De plus, il existe de nombreuses réactions

croisées dues à des antigènes communs aux protozoaires. Une étude a montré que des chiens infectés expérimentalement par *B. gibsoni* présentaient des réactions sérologiques positives avec des antigènes de *B. canis* (Yamane *et al.*, 1993). Ces réactions croisées disparaissent lorsqu'on dilue le sérum.

On considère que l'animal est infecté si la réponse est toujours positive au bout d'un certain nombre de dilutions, ce nombre est difficile à fixer car il dépend de nombreux paramètres. La quantité d'anticorps produite varie en fonction de la réponse immunologique de l'animal et de l'espèce de parasite responsable de la maladie (Yamane *et al.*, 1993).

Les techniques utilisées par les laboratoires ne sont pas standardisées et les réponses obtenues après dilution varient.

Afin d'éviter les faux positifs on considère que l'animal est infecté si on obtient toujours une **réponse positive lors d'une dilution au 128^{ème} ou 256^{ème}** (Homer *et al.*, 2000).

.VIII.2.4.Valeur de la technique

Avantages

La réaction est **assez spécifique** et permet de détecter les chiens ayant une infestation **chronique avec une parasitémie faible** infection et indétectable sur un frottis.

Ce test est **peu coûteux**.

Cette technique permet également de distinguer des espèces qui engendrent peu de réactions croisées.

Inconvénients

Ce test nécessite de disposer d'un microscope à fluorescence et d'un **personnel qualifié** pour la lecture des lames. De plus, cette réaction est souvent **difficile à interpréter** à cause des impuretés dans le sérum qui permettent la fixation des fluorochromes et est soumise à la subjectivité du lecteur.

Des anticorps dirigés contre d'autres parasites peuvent engendrer des **réactions croisées** et ainsi être à l'origine de **faux positifs** ce qui altère la spécificité de cette technique.

Les patients immunodéficients peuvent avoir une réponse immunitaire faible et ainsi générer des **faux négatifs**.

VIII.3.ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

.VIII.3.1.Principe

Le test Elisa est un test immunologique destiné à détecter et/ou doser une protéine dans un liquide biologique.

Cette méthode repose sur une réaction immuno-enzymatique. Dans cette réaction, l'antigène ou l'anticorps est marqué avec une enzyme qui permet de transformer un substrat incolore en un produit coloré. L'Elisa indirect est le plus fréquemment utilisé.

.VIII.3.2.Réalisation

Sur un support solide sont fixés les antigènes (antigènes natifs ou protéines recombinantes ou peptides). Le sérum à tester est dilué et mis à incuber avec les antigènes.

A la fin de l'incubation, des lavages sont effectués pour éliminer les anticorps non fixés.

Un sérum anti-anticorps marqué avec une enzyme est ensuite ajouté. Un nouveau lavage est effectué à la fin de l'incubation.

La fixation de l'anti-anticorps est ensuite révélée par l'ajout d'un substrat qui donne une réaction colorée avec l'enzyme. Les résultats obtenus en quelques heures sont lus au spectrophotomètre.

.VIII.3.3.Interprétation

Les résultats peuvent être **quantitatifs ou qualitatifs**.

La lecture des résultats est réalisée grâce à un spectrophotomètre.

.VIII.3.4.Valeur de la technique

Avantages

Cette méthode possède une bonne **sensibilité et spécificité**. La **lecture est objective** (par densité optique) à la différence de celle de l'I.F.I.

Inconvénients

Ces méthodes sont **longues et onéreuses**.

La quantité d'anticorps dans le sérum dépend de la réponse immunitaire de l'hôte, du délai entre l'infection et la prise de sang. De plus, il faut que la séroconversion ait déjà eu lieu lors de la prise de sang. Une réponse positive indique que l'animal est (ou a été récemment) infecté mais ne confirme pas pour autant que les signes cliniques observés sont dus à un piroplasme (Verdida *et al.*, 2004).

VIII.4.Conclusion générale sur les méthodes immunologiques

.VIII.4.1.Avantages

Ces tests sont en général **sensibles** et permettent de détecter des taux très faibles d'anticorps.

.VIII.4.2.Inconvénients

Ces tests sont **modérément spécifiques** car ils sont sujets aux réactions antigéniques croisées dues aux antigènes communs entre les différentes espèces de piroplasmes. Ce manque de spécificité rend impossible les distinctions entre les sous-espèces de piroplasmes.

De plus, ces techniques révèlent un contact entre le piroplasme et l'animal, mais seule une cinétique permettrait de confirmer l'existence d'une babésiose évolutive, méthode malheureusement incompatible avec la nécessité d'obtenir un résultat rapide.

Ces tests peuvent aussi engendrer des **faux négatifs** chez des animaux très jeunes ou infectés il y a peu de temps ; en effet les anticorps mettent environ 8 à 10 jours pour être produits.

Il n'existe **pas de corrélation entre un taux élevé d'anticorps et une parasitémie élevée**. Il n'existe aucun test permettant de détecter les antigènes.

IX. Amplification génétique

IX.1.Principe général de la PCR

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est une méthode découverte en 1983 et mise au point par Mullis en 1985, qui permet de sélectionner un fragment d'ADN de 100 à plusieurs milliers de bases nucléotiques à partir d'un génome complexe et une amplification enzymatique *in vitro* de celui-ci.

Il s'agit d'une technique d'amplification d'un segment d'ADN compris entre 2 régions de séquences connues. Cette technique utilise une des propriétés des ADN polymérases qui est de ne pouvoir synthétiser le brin complémentaire d'une séquence qu'à partir d'une amorce. On utilise deux amorces oligonucléotidiques de synthèse complémentaires des extrémités 5' des 2 brins d'ADN encadrant la séquence à amplifier. Une de ces amorces est complémentaire du brin codant et une autre du brin non codant. Sous l'action d'une ADN polymérase, chaque amorce est allongée dans le sens 5'-3' (Krieger 1999).

Un cycle de PCR est composé de trois étapes : une séparation des brins d'ADN, une hybridation des amorces et enfin une élongation par une ADN polymérase. La répétition des cycles aboutit à une amplification exponentielle de la séquence cible.

IX.2.Matériel

Un échantillon de PCR standard comporte environ 5µL d'ADN à amplifier (soit entre 1 à 1000 nanogrammes), entre 10 et 25 pmol de chaque amorce, entre 20 et 200 µmol de chaque dNTP (qui sont les nucléotides qui permettent l'amplification), 10 µL de tampon et environ 2 unités d'ADN polymérase. Les quantités de chaque composant varient en fonction de la technique utilisée.

IX.3.Amorces

Elles sont spécifiques du fragment d'ADN que l'on souhaite amplifier. Elles sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier. Elles contiennent en général 20 à 30 nucléotides ce qui garantit leur spécificité.

IX.4.Nombre de cycles

Il est compris entre 30 et 50. Les cycles doivent être suffisamment nombreux pour donner un signal détectable sur le gel mais sans créer d'accumulation de produits non spécifiques.

IX.5.Enzymes

Il s'agit d'**ADN polymérases thermostables**. Il en existe de nombreuses provenant de bactéries : *Thermus aquaticus* (Taq polymérase), *Pyrococcus furiosus* (Pfu polymérase), *Thermococcus litoralis* (Vent ou Tli polymérase) ou encore *Thermus thermoiphilus* (Tth polymérase). L'intérêt de ces enzymes est qu'elles sont thermostables et donc qu'elles n'ont pas besoin d'être remplacées à chaque cycle.

IX.6.Tampon réactionnel

Il sert à maintenir stable le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour la taq polymérase. Il contient des cations bivalents Mg^{2+} qui sont des cofacteurs indispensables pour la réaction de polymérisation avec la Taq polymérase. La présence dans le milieu de cations polyvalents et monovalents (NH_4^+ , K^+) vont neutraliser les charges négatives des groupements phosphates au niveau de l'ADN et ainsi stabiliser les hydrides ADN/ADN.

IX.7.Technique

.IX.7.1.Extraction de l'ADN

Le sang veineux est prélevé à la veine jugulaire ou à la patte et est placé dans un tube EDTA qui empêche la coagulation ce celui-ci.

Il existe plusieurs kits pour extraire l'ADN qui utilisent des protéinases.

L'ADN est ensuite placé dans un amplificateur avec les amorces, les nucléotides, l'ADN polymérase et la solution tampon. La cuve est placée dans un bain marie à sec, dans une cuve en acier léger qui permet d'effectuer les changements de température.

.IX.7.2.Dénaturation

L'ADN est tout d'abord dénaturé pendant 5 minutes à 95°C, il y a alors séparation des brins d'ADN (Figure 16).

.IX.7.3.Hybridation

Puis la température est diminuée. La température choisie est comprise entre 45°C et 60°C, elle dépend des amorces choisies. Il y a alors hybridation des amorces. Cette étape dure une minute environ, afin de laisser le temps aux amorces de s'hybrider correctement, l'ADN étant plus long, il n'aura pas le temps de se réhybrider (Figure 16).

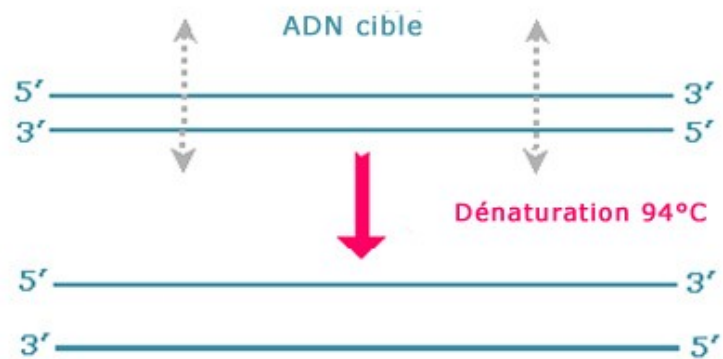
.IX.7.4.Elongation

Enfin, la température est augmentée jusqu'à 72°C environ pendant 4 à 120 secondes, ce qui permet à la Taq polymérase d'ajouter des nucléotides aux amorces hybridées dans le sens 5'-3'. Ce brin est synthétisé à partir des nucléotides libres présents dans le milieu réactionnel. Cette étape permet donc l'élongation de l'amorce, elle dure plus ou moins longtemps suivant la longueur du segment à amplifier (Figure 15).

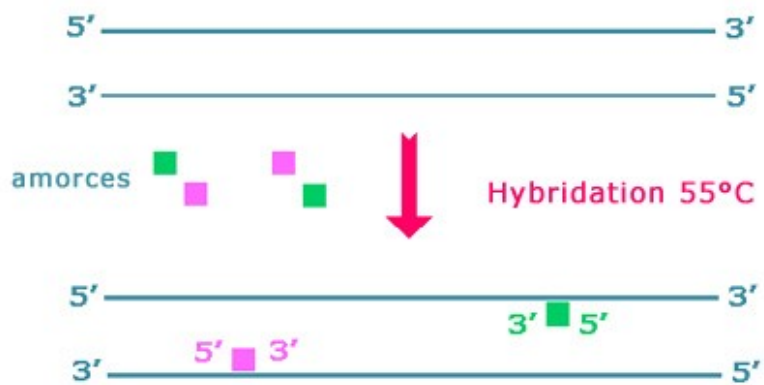
Ce cycle « dénaturation, hybridation, élongation » est réalisé environ 30 fois ce qui aboutit théoriquement à 2^{30} copies du fragment d'ADN originel. Au fur et à mesure de l'avancée de la PCR, les copies d'ADN s'accumulent et modifient le milieu réactionnel. La viscosité augmente et les amorcent et les oligonucléotides diminuent. De plus, la synthèse d'ADN est accompagnée de la libération d'ions pyrophosphates, qui en concentration élevée, inhibent l'activité de la Taq polymérase.

Figure 15 : Déroulement d'un cycle de PCR

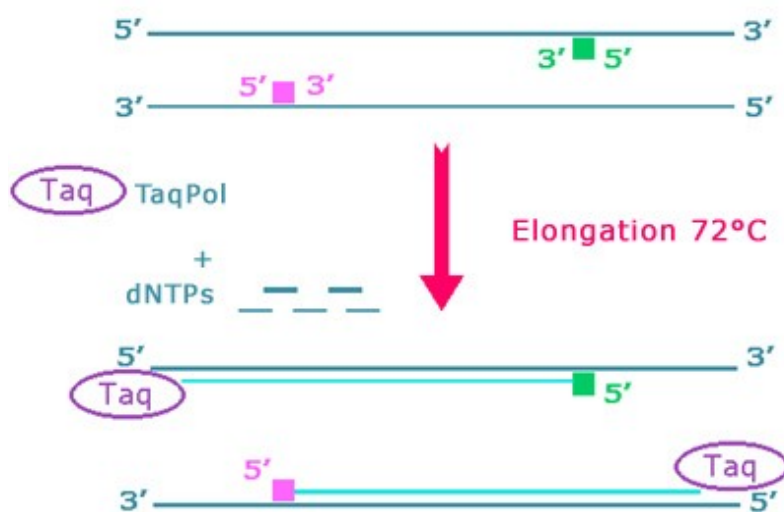
Dénaturation



Hybridation



Élongation



IX.8. Différents types de PCR

.IX.8.1. PCR classique

Elle suit le principe expliqué ci dessus.

La lecture des résultats se fait grâce à une électrophorèse.

.IX.8.2. PCR nichée

Pour augmenter la sensibilité de la PCR on peut réaliser une PCR nichée ou « PCR emboîtée » ou « PCR gigogne » (*nested-PCR*).

Il s'agit de **deux PCR successives** : on réalise une première PCR à partir de l'échantillon, puis on effectue une deuxième PCR à partir des produits d'amplification obtenus (avec éventuellement un couple d'amorces différent). On identifie enfin les produits obtenus grâce à une électrophorèse.

Par un jeu de dilution à partir de sang de chiens infectés (avec un taux estimé par microscopie optique de $9,03 \times 10^4$ hématies infectées par microlitre), on estime que cette méthode permet de détecter un taux de parasite de 0.000118% soit 9.90 hématies infectées par microlitre (Ano *et al.*, 2001). Ce test est 180 fois plus sensible que la PCR classique pour détecter *B. gibsoni*, Birkenheuer *et al* ont réussi à détecter *B. gibsoni* (souche asiatique) jusqu'à un pourcentage de parasitémie très faible de 0,00000073% (Birkenheuer *et al.*, 2004).

Birkenheuer *et al.*, ont aussi démontré que cette technique permettait de différencier *B. gibsoni* de *B. canis canis*, *B. canis vogeli*, et de *B. canis rossi*. Par contre, les amorces utilisées dans cet article ne permettent pas de détecter *T. annae* ni *B. gibsoni* souche californienne (Birkenheuer *et al.*, 2004).

Avantage

Cette méthode est très sensible.

Inconvénients

Cette méthode présente un **risque accru de contamination**. La réalisation de deux PCR successives rend impossible la quantification de l'ADN amplifié.

Comme toutes les PCR, cette technique met en évidence l'ADN recherché mais ne prouve pas que cet organisme soit encore vivant et responsable des symptômes.

Cette technique **manque de sensibilité** pour détecter *T. annae* et *B. gibsoni* souche californienne.

.IX.8.3.PCR en temps réel

Cette technique consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle.

Lors de la réaction d'amplification par PCR, le colorant libre en solution exhibe peu de fluorescence. Durant l'étape d'élongation, une augmentation de la fluorescence est associée à la quantité de colorant se fixant à l'ADN double brin naissant. Lorsque suivi en temps réel, l'augmentation du signal de fluorescence est observée pendant l'étape de polymérisation et l'émission fluorescente décroît complètement lorsque l'ADN est dénaturé à l'étape suivante. Conséquemment, l'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles par un système de lecture intégré à l'appareil de PCR en temps réel qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction (Bustin, 2000, Matsuu *et al.*, 2005).

Avantages

Comparée aux PCR conventionnelles, cette méthode permet de réaliser une **analyse quantitative** des résultats. Comme cette technique comprend généralement des systèmes en tubes fermés et que la quantification ne requiert aucune manipulation post- amplification, **les problèmes de contamination post-PCR par les amplicons sont fortement réduits.**

Comme les autres techniques d'amplification génomiques, cette méthode présente également une **grande spécificité**.

.IX.8.4. Technique LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*)

À la différence des techniques expliquées ci-dessus, cette amplification d'ADN se réalise à température constante. Elle a été développée par Notomi *et al.* en 2000.

La particularité de cette technique est permise par les amorces. En effet, elles présentent une partie spécifique d'un ADN cible et une partie comportant une séquence palindromique, permettant à cette amorce d'adopter une structure en « épingle à cheveux ». Les parties spécifiques encadrent une région d'ADN cible longue de quelques centaines de paires de bases (David et Turlotte, 1998).

On chauffe brièvement l'ADN cible, en présence des amorces et de l'ADN polymérase puis on place le tube dans un bain marie à environ 60°C pendant 3 minutes. Les amorces s'hybrident à l'ADN cible et l'ADN polymérase commence l'élongation d'un nouveau brin à partir des amorces. On chauffe très brièvement une deuxième et dernière fois à 100°C, le brin néosynthétisé se dissocie alors et sert à son tour de cible à une nouvelle amorce, qui va servir à synthétiser un nouveau brin (Figure 16).

A partir de cette étape, la réaction a lieu à température constante. Une amorce se fixe sur le brin néosynthétisé et un autre brin est polymérisé. Arrivée à la région en épingle à cheveux, l'enzyme déplace le brin correspondant à la région palindromique et continue la polymérisation.

A la température de 50°C, on obtient rapidement un équilibre entre la forme linéaire de l'ADN néoformé et une forme avec deux épingle à cheveux. L'une des deux régions en épingle à cheveux possède une extrémité 3' libre qui peut servir d'amorce pour l'ADN polymérase, elle synthétise alors un nouveau brin et déplace le brin complémentaire, jusqu'à ce qu'il se détache. La réaction se poursuit ensuite de cette façon (Notonomi *et al.*, 2000).

Avantages

Cette méthode possède une **spécificité** identique à l'amplification par cycle thermique mais est trois fois **plus rapide**, et est plus simple à réaliser.

Sa sensibilité est égale à celle de la PCR et se situe autour de 0,0005%. (Ikdaï *et al.*, 2004)

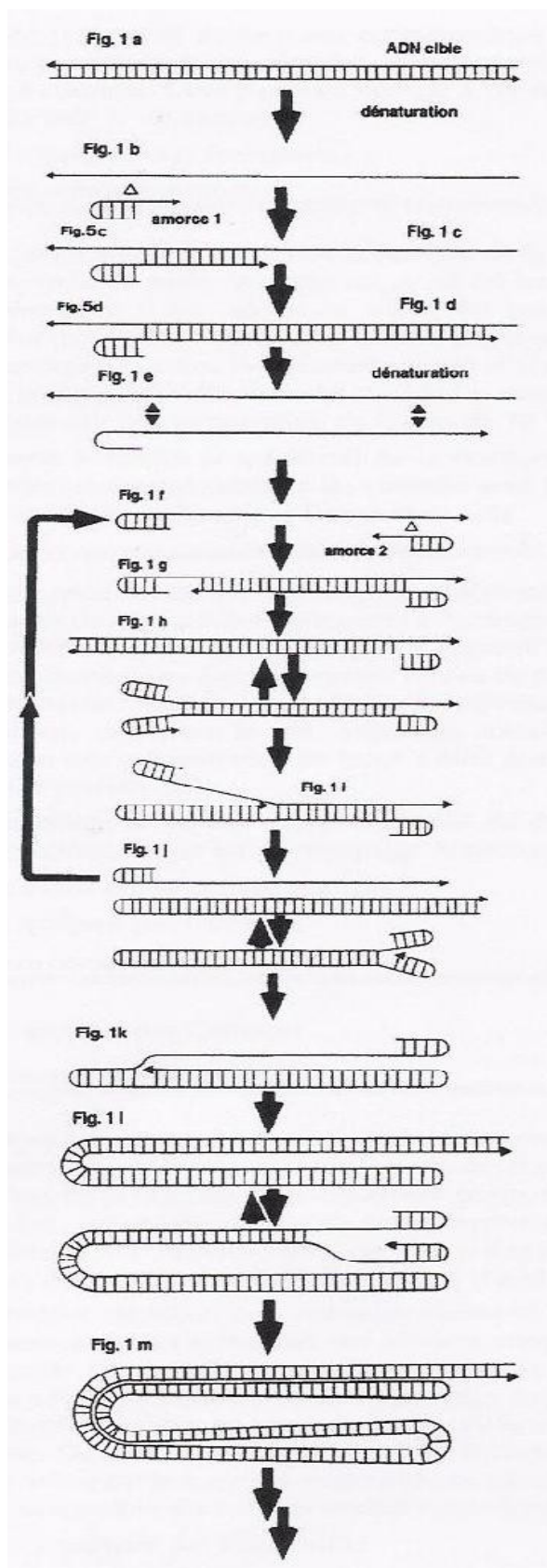
Enfin, il a été rapporté récemment que la LAMP avait une bien meilleure sensibilité que celle de la PCR pour amplifier de l'ADN présent sur du papier filtre (Alhassan *et al.*, 2007). Ceci serait dû à des composants sanguins, comme la myoglobine ou certaines immunoglobulines G, qui inactivent l'ADN polymérase utilisée dans technique de PCR standard mais qui n'inhibent pas la *Bst* polymérase utilisée dans la technique LAMP (Grab *et al.*, 2005).

Inconvénients

Tout comme pour la PCR, en raison de l'extrême sensibilité de cette technique, il faut prendre les précautions d'usages pour éviter les contaminations lors de la préparation de l'ADN.

La température à laquelle se déroule l'amplification dépend des amorces, car il faut obtenir un équilibre entre la forme linéaire et celle en épingle à cheveux des brins synthétisés. Il faut donc trouver la température idéale pour chaque type d'amorce.

Enfin, cette méthode est **coûteuse**.



IX.9. Identification des produits d'amplification

.IX.9.1. Électrophorèse des produits obtenus

Elle consiste en une migration de l'ADN amplifié sur un gel d'agarose plongé dans un tampon et soumis à un champ électrique. Les fragments d'ADN migrent différemment selon leur poids moléculaire : les fragments de faibles poids migrent plus loin que les plus lourds.

Les fragments sont ensuite visualisés par un composé fluorescent sous lumière ultra violette qui est le bromure d'éthidium (BET). Ce composé se fixe sur les acides nucléotidiques (intercalant).

.IX.9.2. Analyse de profil de restriction (RFLP : *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

L'ADN cellulaire est d'abord amplifié par PCR. Puis, il est digéré par une ou plusieurs enzymes de restriction qui reconnaissent certaines séquences nucléotidiques bien précises (Tableau 2). Elles coupent la molécule d'ADN au niveau de ces séquences. Il existe de nombreuses enzymes de restriction.

On réalise ensuite une électrophorèse qui permet la séparation des produits de digestion en fonction de leur poids. Les bandes obtenues sont visibles par coloration au bromure d'éthidium.

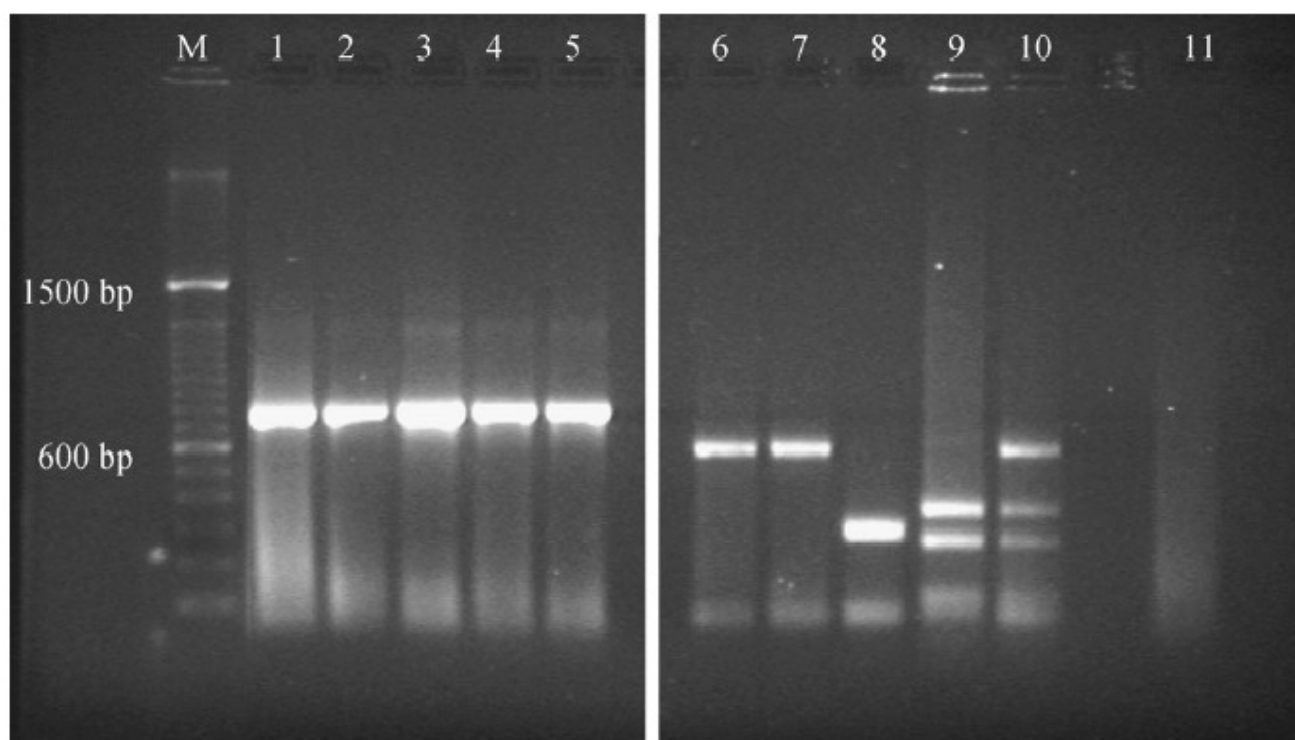
L'identification est ensuite réalisée par comparaison des bandes obtenues avec un profil déjà connu ou par comparaison des profils entre eux (Figure 17). Si l'individu testé possède les mêmes bandes que le profil, alors il s'agit de la même espèce ou sous espèces (Mc Manus et Bowles, 1996).

Jefferies *et al.* ont utilisé cette technique en 2007 afin de différencier les sous espèces de *B. canis* et *B. gibsoni* (Figure 17).

Tableau 2 : Profil de digestion (d'après Jefferies *et al.*, 2007)

Espèces	Nombre de paires de bases du fragment amplifié par PCR	Enzyme de restriction utilisée	Taille (en paire de bases) des produits de digestion
<i>Babesia canis vogeli</i>	791	<i>HinfI</i>	592, 102, 80, 18
<i>Babesia canis canis</i>	792	<i>HinfI</i>	593, 102, 80, 18
<i>Babesia canis rossi</i>	793	<i>HinfI</i>	303, 289, 102, 81, 18
<i>Babesia gibsoni</i>	791	<i>HinfI</i>	321, 270, 102, 81, 18

Figure 17 : Profil de digestion (d'après Jefferies *et al.*, 2007)



Les profils sont obtenus par électrophorèse dans du gel d'agarose 2% les profils 1 à 5 sont réalisés après la PCR et les profils 6 à 10 sont ceux obtenus après la digestion par l'enzyme *HinfI*.

Les profils 1 et 6 sont ceux de *B. canis canis*, 2 et 7 sont ceux de *B. canis vogeli*, 3 et 8 sont ceux de *B. canis rossi*, 4 et 9 sont ceux de *B. gibsoni*, 5 et 10 sont ceux de *B. canis vogeli* et *B. gibsoni*, le 11 est le témoin négatif.

Ces auteurs ont ainsi pu faire la différence entre ces sous espèces et même mettre en évidence une coinfection par *B. gibsoni* et *B. canis vogeli*. Il est possible de faire la distinction entre deux *Babesia* qui ont le même profil électrophorétique en ajoutant une deuxième enzyme de restriction. Ainsi, dans l'expérience réalisée par Jefferies *et al.* en 2007, la digestion de leur ADN par *HinfI* donne des profils identiques, mais il est possible de les différencier grâce à une double digestion par *HincII* et *BsII*.

Avantages

Cette technique est **simple et rapide**. Aucun séquençage de l'ADN n'est nécessaire. L'étape la plus laborieuse est de construire la carte des sites de restriction pour chaque agent pathogène. Une fois réalisée, cette carte permet une identification rapide. Il est possible de détecter une co-infection.

Grâce à de nouvelles méthodes, il est possible sans séquencer l'ADN de déterminer l'espèce responsable de l'infection et même de mettre en évidence des co-infections.

Inconvénients

Cette méthode possède un **coût élevé**, nécessite un matériel spécifique et un personnel expérimenté.

IX.10.Séquençage direct

Il existe deux grandes méthodes de séquençage de l'ADN : la méthode chimique et la méthode enzymatique.

Méthode chimique

Dans un même tube, on place l'ADN à séquencer, des nucléotides, une ADN polymérase. Anciennement, les nucléotides étaient marqués avec du phosphore 32 radioactif, de nos jours, ils sont marqués avec un fluorochrome. Chaque nucléotide porte un fluorochrome qui émet dans une gamme de longueur d'onde différente de celle des autres.

Après amplification, le contenu du tube est soumis à électrophorèse. Au bout du gel, 4 capteurs (un par longueur d'onde différente) enregistrent la lumière émise par les molécules terminées par un ddNTP. Ces quatre graphes sont superposés et un logiciel traduit ce pictogramme en séquence.

Méthode enzymatique

On incube l'ADN à séquencer dans quatre tubes différents avec de l'ADN polymérase, une amorce, des nucléotides et un type de didésoxyribosenucléosides triphosphate (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP). Ces ddNTP n'ont pas de 3'OH et donc stoppent l'élongation de la chaîne. Ils sont ajoutés en faible quantité et arrêtent donc de façon aléatoire la synthèse du nouveau brin d'ADN. On obtient ainsi des fragments de différente longueur correspondant à la position de la base sans 3'OH. La séquence est reconstituée à partir de l'autoradiographie (les amorces sont marquées au ^{32}P) de l'électrophorèse des 4 tubes.

Les séquences d'ADN sont ensuite comparées aux séquences d'ADN de piroplasmes contenues dans des banques de données. Cette comparaison permet d'identifier l'espèce et même la sous espèce ou le sous type de piroplasma.

Avantages

Ces techniques permettent de connaître la **séquence exacte du l'ADN** testé et ainsi d'isoler l'espèce ou la sous espèce mise en évidence dans le prélèvement avec précision.

Inconvénients

Cette méthode est **longue** et nécessite du matériel coûteux.

Tableau 3 : Caractéristiques des différentes techniques diagnostiques

Type examen	Parasitémi e détectable	Avantages	inconvénients
Examen direct			

Frottis sanguin	0,001% (Sobczyk et al., 2005)	- rapide, facile à réaliser - peu onéreux - observation des autres cellules sanguines - identification du type de piroplasma - détection d'autre parasite	- manque de sensibilité et de spécificité - distinction des parasites uniquement morphologiquement
Etude de la réponse immunitaire			
IFI		- peu onéreux - bonne spécificité	- méthode longue - sensibilité dépend de l'intensité de la réponse immunitaire - réactions croisées possibles - peu de standardisation des techniques, interprétation personnel dépendante - pas discrimination sous espèces
Elisa		- bonne sensibilité et spécificité - lecture objective - résultats qualitatifs et quantitatifs	
Amplification génomique			
PCR classique	0,00015% (Sobczyk et al., 2005)	- bonne sensibilité et spécificité - identification sous espèces	- coût - risque de contamination
PCR nichée	0,000118% (Birkenheuer et al., 2004)	- sensibilité très forte et bonne spécificité - identification sous espèces	
PCR temps réel		- bonne sensibilité et spécificité - Résultats qualitatifs et quantitatifs	
LAMP	0,00015% (Alhassan et al., 2007)	- sensibilité identique à celle de la PCR - spécificité élevée - méthode rapide - faible contamination	- coût
Identification des produits obtenus			
Electrophorèse		- rapide	- peu précise
RFLP		- simple et rapide	- coût, matériel spécifique
Séquençage direct		- précis	- coût, temps

X. Conclusion

Le diagnostic épidémiologique ou clinique ne permet pas de façon certaine de mettre en évidence une piroplasmose. La numération formule peut orienter le clinicien vers celle-ci par la mise en évidence d'une anémie (qui est le plus souvent régénérative, normochrome et normocytaire) et d'une thrombocytopénie.

Le frottis sanguin est le premier examen complémentaire qui permette de mettre en évidence le parasite. Il est simple et rapide mais conduit à de nombreux faux négatifs.

Les examens mettant en jeu les anticorps peuvent se révéler intéressants en cas de frottis négatif mais ils ont l'inconvénient d'être modérément spécifiques et peuvent manquer de sensibilité lors de piroplasmose récente.

La technique de choix pour détecter le parasite est la PCR. Elle possède une excellente sensibilité et une très bonne spécificité même en cas de faible parasitémie.

De plus, l'analyse des produits d'amplification de la PCR permet l'identification des piroplasmes et ainsi le suivi de la répartition géographique des espèces et des sous espèces et leur spécificité d'hôte.

**Partie 3 : Travaux réalisés à partir des
données recueillies par le laboratoire
C.A.L à Troyes**

XI. Technique utilisée

Le Companion Animal Laboratory (C.A.L) est le laboratoire avec lequel j'ai pu travailler pour réaliser cette thèse. Ce laboratoire propose une détection des piroplasmes par PCR puis une identification du parasite. Il est situé à Troyes et est dirigé par le Dr vétérinaire Fritz. Quatre manipulateurs y réalisent les analyses. La mise en évidence des piroplasmes est permise par une PCR qualitative.

XI.1. Lyse des hématies

L'échantillon de sang est contenu dans un tube EDTA. On prélève 1 mL de cet échantillon que l'on place dans un tube, dans lequel on ajoute 2,5 mL de tampon fourni par le kit Qiagen N.D. Ce tube est congelé 10 minutes à -20°C qui fait éclater les hématies. Il est ensuite centrifugé à 22°C pendant 15 minutes à 2000 rotation par minutes (rpm). On récupère le culot auquel on ajoute 1 mL de tampon puis on le recongèle 10 minutes dans les mêmes conditions. Puis, le tube est à nouveau centrifugé et le culot est récupéré.

XI.2. Extraction de l'ADN

On ajoute dans ce tube 350 µL d'eau « RNA free » qui est purifiée au maximum pour éviter toute contamination. Pour éliminer les plus grosses impuretés, l'échantillon est centrifugé dans un microtube possédant un filtre pendant 2 minutes à 14000 rotations par minute. On récupère ensuite le produit de filtration.

L'extraction de l'ADN est réalisée automatiquement en plaçant 200µl de solution dans un extracteur d'ADN. La solution y subit des bains successifs qui purifient l'ADN : une solution tampon y est tout d'abord ajoutée, puis l'échantillon est placé avec de la silice à laquelle l'ADN se fixe. La silice est rincée plusieurs fois puis une dernière solution change les propriétés du milieu et l'ADN se détache. Après un dernier rinçage, on obtient de l'ADN pur. L'extraction dure au total 17 minutes.

XI.3.Amplification de l'ADN

Préparation du milieu réactionnel

Toute cette partie se réalise sous une hotte afin d'éviter toute contamination. Chaque soir, la hotte est exposée aux ultraviolets afin de dégrader tout ADN résiduel.

Dans un même tube, on place :

- 8 µL de tampon spécifique de l'enzyme utilisée,
- 0,5 µL d'enzyme,
- 1 µL d'amorces,
- 1 µL d'amorces complémentaires,
- 4 µl de nucléotides,
- 10 µL d'échantillon,
- de l'eau qsp 50 µL.

Deux tubes sans échantillon sont aussi réalisés, l'un constitue le témoin négatif prouvant qu'aucune contamination n'a eu lieu à ce moment. L'autre est le témoin positif de la manipulation, on y ajoute dans une hotte différente et éloignée de celle où est réalisé le milieu réactionnel, 10 µL de solution témoin contenant du parasite en concentration connue. *Pour cause de confidentialité, le nom de l'enzyme utilisée ainsi que la séquence des amorces ne sont pas citées.*

Amplification

Les trois tubes sont placés dans un amplificateur. Ils subissent un premier cycle à 94°C pendant 5 minutes.

Ils sont ensuite placés 1 minute à 94°C, ce qui permet la dénaturation, puis 1 minute à 60°C l'échantillon subit alors une amplification, et enfin 3 minutes à 72°C ce qui permet l'élongation des brins. Cette succession de cycles est répétée 40 fois.

Enfin, la température est portée à 72°C pendant 10 minutes. L'échantillon est conservé à 4°C dans l'appareil jusqu'à ce que les manipulateurs le récupèrent.

XI.4.Migration

La migration est réalisée sur gel de polyacrylamide. Ce gel est plus toxique que le gel d'agarose, mais il possède une résolution plus importante c'est pour cela qu'il est choisi par le laboratoire.

10 µL de chaque solution sont déposés dans chaque puits. Un gel peut contenir au maximum 10 puits. Une migration est ensuite réalisée. On ajoute un tampon de charge constitué de glycérol et de bleu de méthylène, dans chaque puits. Le tampon permet d'alourdir l'échantillon et améliore donc sa migration. Le gel est placé dans une cuve avec un tampon de migration. La cuve est remplie jusqu'à ce que le tampon affleure le haut des puits. On applique enfin un courant de 11 mA d'intensité et de 75 V de tension durant 90 minutes (Tableau 4).

Une fois la migration finie, le gel est placé dans un bain contenant 10 µL de bromure d'éthidium dilué dans 200 mL d'eau, durant 15 minutes. Ce produit est intercalant, il se place entre les brins d'ADN et permet de lire ensuite le gel.

Etapes		Matériel	Méthode
Lyse des hématies	Etape 1	- 1 ml de l'échantillon - 2,5 mL de tampon	- Congélation 10 min à -20°C - Centrifugation 15 min à 2000 rpm à 22°C
	Etape 2	- Culot obtenu par l'étape 1 - 1 mL de tampon	- Congélation 10 min à -20°C - Centrifugation 15 min à 200rpm à 22°C
Extraction d'ADN	Etape 3	- Culot obtenu par l'étape 2 - 350 µL d'eau « ARN free »	- Centrifugation dans un microtube avec filtre à 14000 rpm pendant 2 min
	Etape 4	- 200 µl du produit de filtration de l'étape 3 - Solution tampon - Bille de silice	Bains successifs
Amplification	Etape 5	- 10 µl de la solution obtenue par l'étape 4 - milieu réactionnel	- <u>Incubation</u> 5 minutes à 94°C - <u>Répétition 40 fois du cycle</u> * 1 minute à 94°C * 1 minute à 60°C * 3 minutes à 72 °C - 10 minutes à 72°C - conservation à 4°C
Migration	Etape 6	- 10 µl de la solution obtenue par l'étape 5 - Gel polyacrilamide	90 minutes dans une cuve avec un courant de 11 mA et 75 V

XI.5.Lecture du gel

La lecture de plaque est informatisée. La plaque est placée dans un appareil qui envoie un rayonnement ultra-violet qui rend l'ADN fluorescent. Le signal est récupéré par une caméra. Le logiciel *Biorad quality one* N.D. pilote cette caméra. Le gel apparaît alors sur l'écran (Figure 18).

Il ne doit y avoir aucune migration dans le puits correspondant au témoin négatif. Le témoin positif présente une bande de migration. Si l'échantillon est négatif, il n'y a aucune bande de migration. S'il est positif, on observe une bande de migration qui est à la même hauteur que celle du témoin positif.

Figure 18 : Profil de migration des échantillons testés



Le témoin positif est la colonne intitulée « + » et le négatif « - », 6 échantillons sont testés sur ce gel. Les échantillons 1, 4, 6 sont négatifs. Les échantillons 2 et 5 sont positifs à forte charge (la bande de migration est épaisse) et le 3 est positif faible charge (la bande de migration est fine).

XI.6.Profils de restriction

Pour identifier le parasite isolé, le laboratoire à recours à une méthode de digestion de l'ADN qui permet d'obtenir des profils de digestion correspondant à une sous espèce de piroplasme.

La digestion est réalisée à partir du produit amplifié. On fait agir deux enzymes de restriction dans 15 µl d'ADN amplifié auquel on ajoute deux tampons spécifiques de chaque enzyme pendant 2 heures à 37°C puis 2 heures à 50°C. Pour cause de confidentialité, les noms des enzymes ne sont pas cités, nous appellerons la première enzyme « enzyme 1 » et la seconde « enzyme 2 ».

Un premier profil de digestion obtenu après action des enzymes 1 et 2 (Figure 19).

Un deuxième profil est obtenu après digestion du produit amplifié par l'enzyme 3 (Figure 20). La présence d'un témoin de poids moléculaire (à gauche sur le premier gel et à droite sur le second) permet de définir le poids moléculaire de chaque bande et ainsi de typer le piroplasme en fonction de son profil de digestion.

Figure 19 : Profil de migration de la première digestion

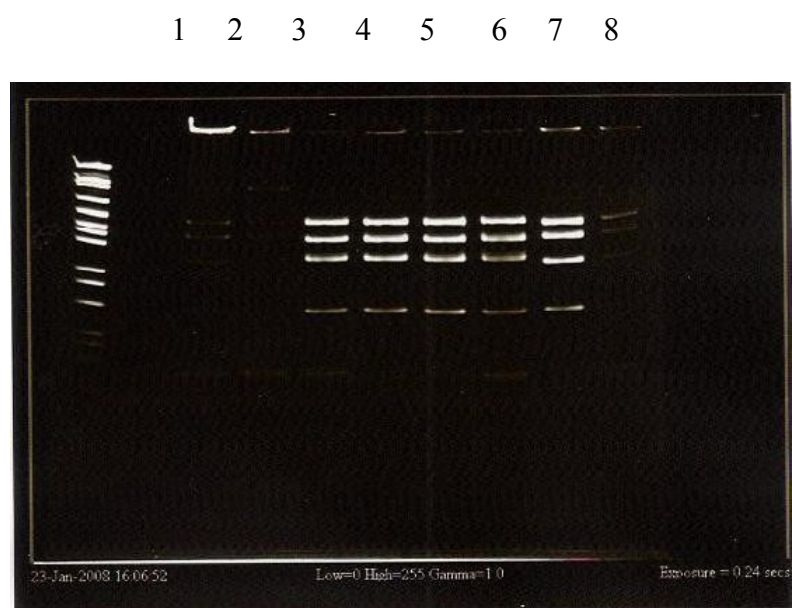
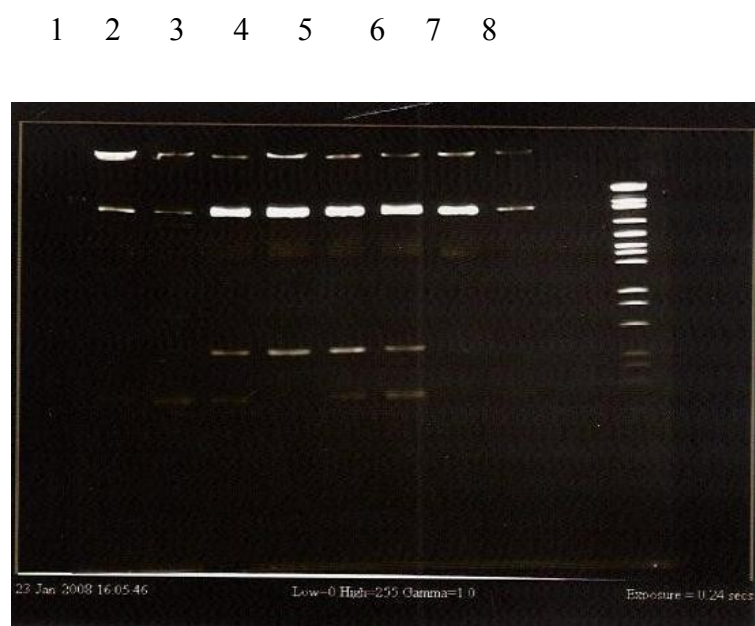


Figure 20 : Profil de migration de la seconde digestion



Deux digestions d'un même ADN parasite permettent au laboratoire de typer le piroplasme.

XI.7.Critique de la technique employée

La méthode utilisée au laboratoire est rapide, la présence ou l'absence du parasite sanguin est connue en une journée et demie. Le profil de digestion est obtenu plus tardivement car il nécessite de laisser les enzymes de restriction agir sur les produits d'amplification.

Les témoins positifs et négatifs permettent de valider la technique à chaque manipulation et rendent le résultat fiable.

La limite actuellement rencontrée par cette technique est la présence de profils de digestion proches entre des piroplasmes. Les fragments ne diffèrent que de quelques dizaines de paire de bases et il est impossible de différencier les parasites sur les profil de migration. La seule façon de résoudre le problème serait de réaliser une troisième digestion, ou d'utiliser une enzyme plus discriminante mais cette recherche est coûteuse et nécessite du temps.

XII. Analyse des données obtenues à partir des PCR positives

Cette étude regroupe les dossiers de **75 chiens** ayant eu une PCR positive pour la piroplasmose canine entre **15 mars 2006 et le 4 janvier 2008**. Les prélèvements proviennent de chiens habitants en France, indépendants les uns des autres et infectés naturellement.

Cinquante de ces PCR ont été demandées par les vétérinaires traitants, et pour 7 d'entre elles, les vétérinaires ont demandé également une numération formule. Les 25 autres PCR ont été réalisées par le Dr Fritz, à titre personnel, lorsqu'il détectait des piroplasmes sur un frottis sanguin.

Pour les PCR demandées, le laboratoire quantifie la charge parasitaire. En mars 2006, le laboratoire ne proposait pas encore cette quantification, il manque donc cette donnée pour 3 prélèvements. Pour les PCR réalisées à titre personnel par le laboratoire, aucune quantification n'est effectuée.

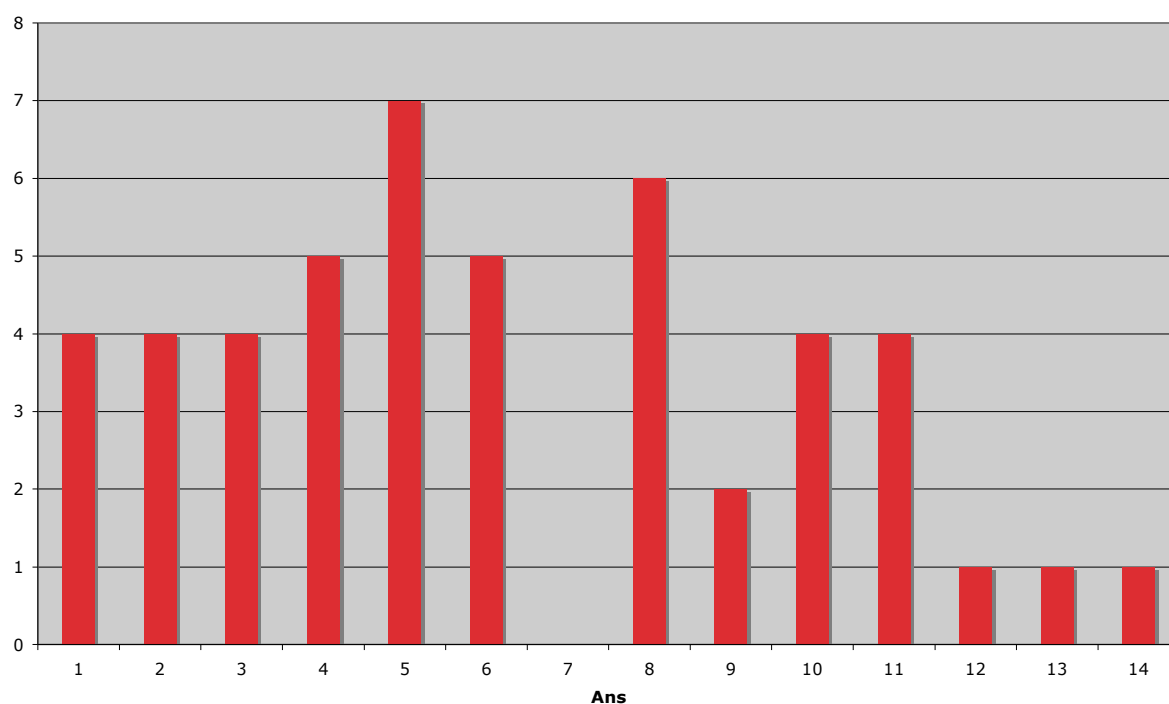
Chaque animal ayant eu une numération formule a également eu un frottis sanguin. Quelques PCR pour rechercher d'autres parasites sont réalisées à la demande des vétérinaires traitants.

Le reste des données analysées est obtenu à partir des fiches commémoratives accompagnant le prélèvement. Il s'agit du sexe, de l'âge et de l'origine géographique de la clinique vétérinaire. L'ensemble des données issues de ces dossiers est regroupé en annexe 1.

XII.1. Age des animaux atteints

Sur les 75 dossiers étudiés, l'âge de 48 chiens est connu. **L'âge moyen** des chiens est de **5 ans**. Les animaux atteints de piroplasmose sont des **animaux jeunes**, la moitié (24 animaux), a entre 1 et 5 ans. Un tiers des animaux (17 chiens) a entre 6 et 10 ans et 5% (4 chiens) ont entre 11 et 14 ans (Figure 21).

Figure 21 : Age des animaux atteints de piroplasmose



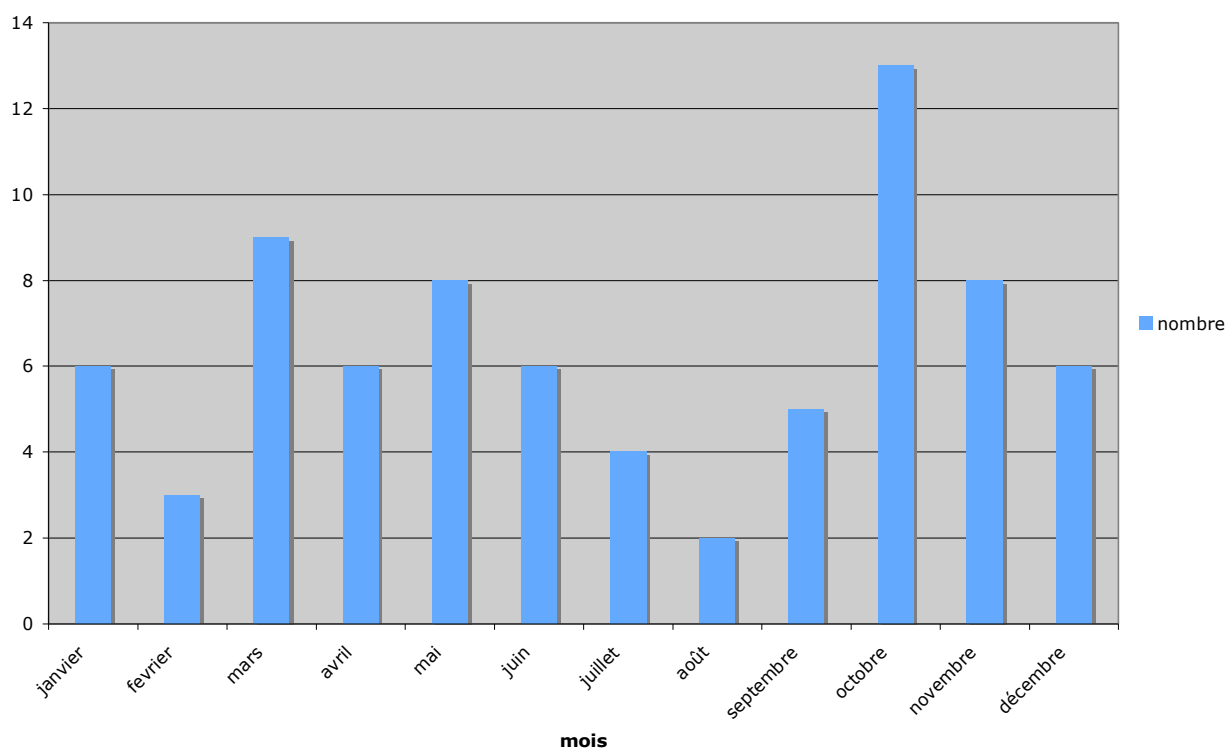
Cette donnée est en accord avec l'étude réalisée par Bourdeau et Guelfi en 1995, la piroplasmose **touche plus fréquemment les jeunes animaux**. Néanmoins on observe ici, un nombre non négligeable de chiens plus âgés puisque 33% des animaux ont entre 6 et 10 ans.

XII.2. Sexe des animaux atteints

L'âge est connu pour 68 animaux. Les chiens ayant une PCR positive sont majoritairement des mâles : il y a **45 mâles pour 23 femelles**. Ce résultat est surprenant car l'étude réalisée par Bourdeau et Guelfi en 1995, ne montre pas de différence entre mâles et femelles.

XII.3.Répartition des PCR positives sur l'année

Figure 22 : Nombre de PCR par mois (données cumulées de mars 2006 à janvier 2008)



L'étude a été réalisée sur deux années. On observe un **premier pic** de PCR positives **entre les mois de mars et mai**, il correspond au **printemps**, et un **deuxième pic de septembre à novembre qui correspond à l'automne** (Figure 22). Le nombre de PCR positives est moins important l'hiver (de décembre à février) et l'été (de juin à août). Cette répartition des cas peut s'expliquer par la période d'activité des tiques vectrices du piroplasme.

En effet, *Dermacentor reticulatus*, est une espèce de tique qui est active pratiquement **de manière continue avec une pause en été et en hiver**. Cette espèce de tique est le vecteur principal de *Babesia canis canis*, qui est le piroplasme le plus retrouvé en France. L'activité de ce vecteur explique donc la répartition des cas obtenue.

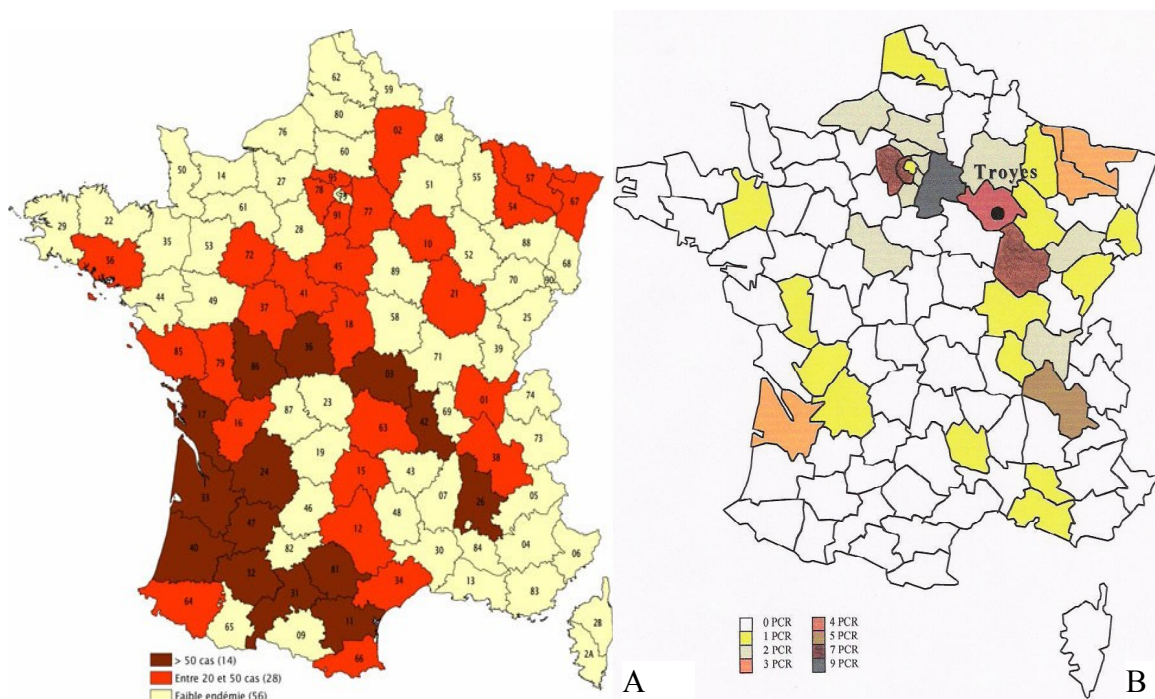
Si on s'intéresse particulièrement à la répartition annuelle des PCR détectant une *Theileria*, on remarque que **7 des 10 PCR ont été réalisées l'hiver** (2 en février, 3 en janvier et 2 en décembre). Cette particularité laisse penser que le vecteur de ce piroplasme est

différent de celui de *Babesia canis canis*. Aucun vecteur de *Theileria* n'a été isolé en France, le vecteur supposé de *Theileria annae* en Espagne est *Ixodes hexagonus* mais ce vecteur a la même période d'activité que *Dermacentor reticulatus* et n'explique pas l'augmentation de la prévalence du parasite l'hiver.

XII.4. Origine géographique

XII.4.1. Répartition géographique de toutes les PCR

Figure 23 : Carte A : prévalence de la piroplasmose en France, Carte B : répartition des PCR positives par département



La majorité des PCR positives sont issues de **l'Est de la France** et sont proches du laboratoire (Figure 23). Ceci peut s'expliquer par le fait que les vétérinaires travaillent avec un laboratoire proche de chez eux.

Néanmoins, lorsqu'on compare la répartition des cas de piroplasmoses obtenue par l'étude de Bourdoiseau et Renard en 2005 et la répartition des PCR du laboratoire, on observe des similitudes. Les départements qui comptent **le plus de PCR positives sont aussi ceux pour lesquels Bourdoiseau et Renard avaient recensé le plus de cas.**

Les PCR sont **majoritairement issues de Paris et sa banlieue** (département 75, 77, 91, 92, 94), départements pour lesquels l'enquête réalisée par Bourdoiseau et Renard en 2005 indiquait une prévalence de 25 à 50 cas par an et par vétérinaire. Ce nombre conséquent de PCR positives, peut s'expliquer par la prévalence du parasite, mais aussi par la proximité des vétérinaires avec le laboratoire.

Les vétérinaires de **Moselle (57) et de la Marne (51)** traitent entre 20 et 50 cas de piroplasmoses par an selon Bourdoiseau et Renard, et le laboratoire a obtenu 4 PCR positives pour chacun de ces départements. Il en est de même pour le département de la **Côte d'or (21)**, où 7 PCR positives ont été obtenues. 7 prélèvements issus de l'**Isère (38)**, qui est pourtant éloignée du laboratoire, étaient également porteurs de piroplasmes.

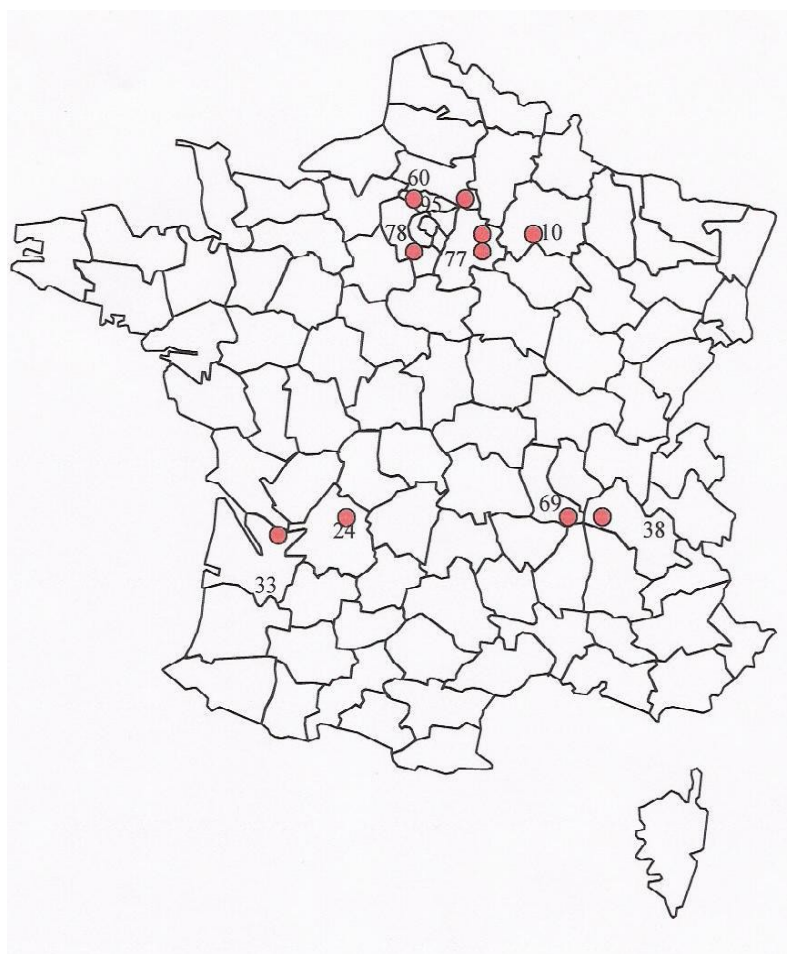
L'enquête de Bourdoiseau et Renard a montré un **nombre de cas élevé dans l'Ouest** de la France. Sur la période étudiée, le laboratoire a aussi isolé des parasites sur des prélèvements sanguins provenant de ces régions : la **Gironde (33)** a envoyé 4 échantillons positifs, la **Dordogne (24)** un prélèvement, la **Charente (16)** un prélèvement et les **Deux-Sèvres (79)** un prélèvement également. Malgré, l'éloignement géographique, 7 chiens de cette étude proviennent de ces régions, ce qui montre **l'importance de la piroplasmose dans celles ci**.

Dans les départements moins touchés, le laboratoire a reçu un, voire aucun prélèvement positifs ce qui est aussi en accord avec la prévalence décrite du piroplasme.

Pour certains départements fortement infestés, le laboratoire ne comptabilise pas de PCR positives. C'est le cas des départements de la région Midi-Pyrénées (66, 34, 81, 12) certains départements de la région Centre (28,37,36,18). Ainsi que les Landes (40) et l'Aquitaine (64). Le laboratoire réalise des PCR à la demande des vétérinaires, mais aussi sur lorsque des piroplasmes ont été visualisés sur le frottis sanguin accompagnant la numération formule. L'absence de données dans ces régions est due soit à l'éloignement géographique entre le laboratoire et la clinique vétérinaire, soit à la réalisation des frottis par les vétérinaires eux mêmes.

.XII.4.2.Répartition des cas de *Theileria*

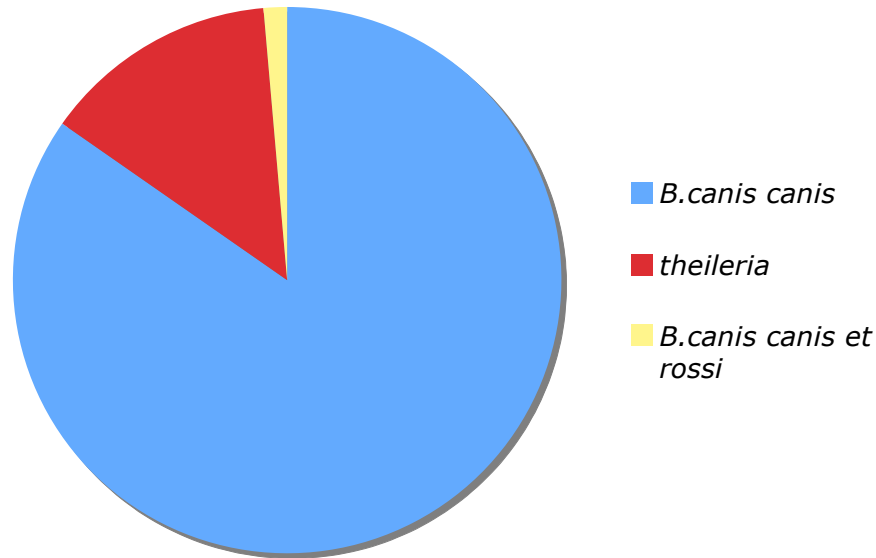
Figure 24 : Répartition des cas de *Theileria*



Les 9 prélèvements à partir desquels ont été isolées des *Theileria* proviennent de **3 endroits de la France**. la Région parisienne avec les départements l'Oise et le département de l'Aube constituent un premier secteur et comptent 6 cas. La Dordogne et la Gironde forment un deuxième secteur avec 2 cas et enfin les départements du Rhône et de l'Isère un dernier secteur avec 2 cas également. Aucun cas de *Theileria* n'a encore été décrit en France, mais il serait intéressant de surveiller ces zones sur une plus longue durée pour vérifier si ce piroplasma y est encore retrouvé.

XII.5.Type de piroplasme

Figure 25 : Répartition des piroplasmes identifiés par les PCR-PRFLP au laboratoire C.A.L.



Babesia canis canis est retrouvée en grande majorité chez les chiens infestés, elle est mise en évidence dans **84% des prélèvements** (Figure 25). Cette donnée est en accord avec les données épidémiologiques parues dans la littérature, *B. canis canis* est le piroplasme le plus fréquent en France.

Theileria est trouvée dans **12% des prélèvements**. Ce résultat est surprenant car aucune publication ne décrit la présence de ce piroplasme en France chez le chien. A l'heure actuelle, le laboratoire n'a pas encore fait séquencer l'ADN de ce piroplasme et on ne peut affirmer avec certitude qu'il s'agit de *T. annae*.

Babesia canis rossi a été détectée chez un seul animal, elle était associée à *B. canis canis*. Ce chien a voyagé en Afrique du Sud ce qui explique la présence de ce piroplasme en France.

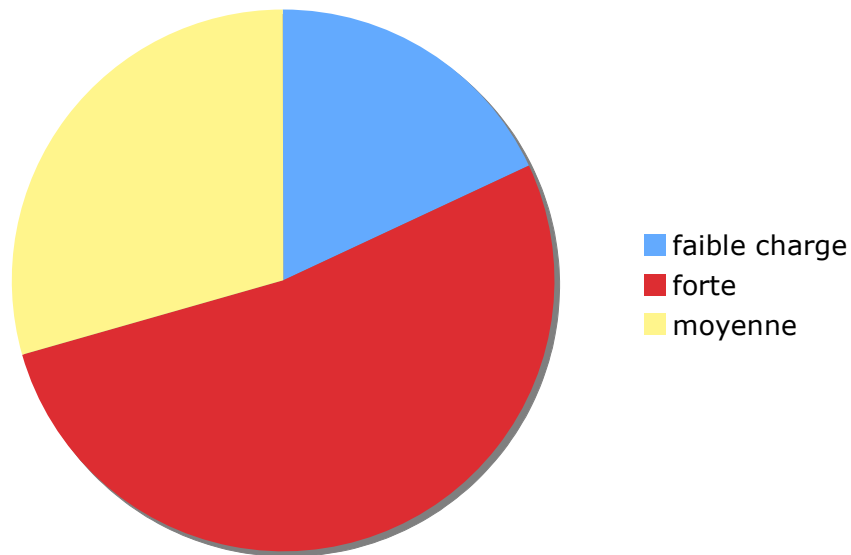
Aucune *Babesia gibsoni* n'est mise en évidence.

XII.6.Charge parasitaire

La charge parasitaire est déterminée en fonction de l'épaisseur de la bande obtenue sur le profil de migration. Si la bande obtenue est très épaisse, la charge parasitaire est qualifiée de forte, si elle est très fine, elle est qualifiée de faible et si elle est intermédiaire, elle est qualifiée de moyenne.

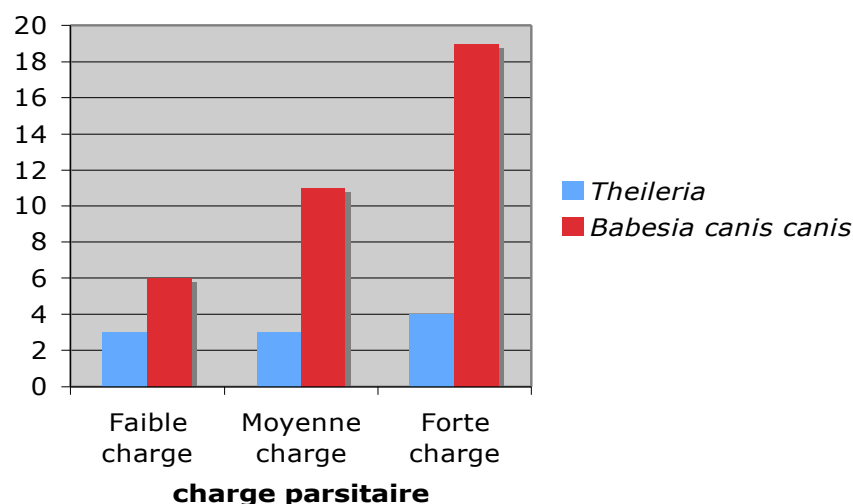
La majorité des animaux ayant une PCR positive ont **charge parasitaire forte** (52% des chiens), la charge parasitaire est moyenne dans 30% des cas et faible dans 18% des cas (Figure 26).

Figure 26 : Charge parasitaire des animaux malades



Sur l'échantillon étudié, les chiens touchés par *Babesia canis canis* ont une charge parasitaire forte pour la grande partie d'entre eux. Par contre la charge parasitaire de *Theileria* est variable (Figure 27).

Figure 27 : Répartition de la charge parasitaire des animaux en fonction du piroplasme



XII.7.Co-infection

Une seule co-infection de deux sous espèces de *Babesia* a été isolée chez un chien. Il s'agit d'une coinfection de *Babesia canis canis* et de *Babesia canis rossi* chez un chien ayant voyagé en Afrique du Sud.

Aucune co-infection de *Babesia* et de *Theileria* n'a été trouvée.

Les recherches d'autres agents pathogènes n'ont été réalisées qu'à la demande des vétérinaires traitants. Elles ont été demandées sur 21 des prélèvements. Les bactéries recherchés par PCR sont les *Rickettsia*, *Bartonella*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Borrelia*, *Leptospira*. Une infection à *Borrelia* et *Leptospira* est aussi recherchée par sérologie à la demande de certains vétérinaires. L'ensemble des germes n'a pas été recherché sur chaque prélèvement.

Sur ces 21 prélèvements, **5 étaient positifs pour un autre germe**. Plusieurs articles parus récemment dans la littérature, décrivent également la possibilité de la co-infection d'un piroplasme avec un autre parasite (Heyman *et al.*, 2007). Au sein du groupe d'animaux testés, la sérologie d'un chien est positive au 1/160^{ème} (seuil de positivité 1/80) pour la maladie de Lyme, chez un autre *Bartonella* est mise en évidence par PCR en temps réel en faible charge, deux chiens portent *Leishmania infantum* en faible charge, un *Leishmania infantum* en charge moyenne enfin, un chien est très faiblement positif pour *Ehrlichia*.

Les deux chiens infestés par *Leishmania infantum* sont aussi infestés par *Theileria*. Les vecteurs de ces deux parasites sont différents, aucune co-infection n'est rapportée dans la littérature. Les deux animaux vivent dans le Nord de la France (Oise et Yvelines) où le vecteur de la leishmaniose n'est pas présent, néanmoins, aucun renseignement n'est disponible concernant les voyages de ces animaux et une infestation par *Leishmania infantum* dans le Sud de la France peut être envisagée.

Le piroplasma mis en évidence dans les autres cas de co-infection est *Babesia canis canis*. La co-infection avec *Ehrlichia*, *Rickettsia* ou de *Bartonella* montre l'importance du rôle de vecteur des tiques. La bactériémie d'*Ehrlichia* ou de *Bartonella* est faible et l'absence de PCR avant les symptômes ne nous permet pas de savoir si la co-infection est due à la même tique ou si l'infection par le piroplasma a permis de détecter une infection plus ancienne.

XII.8.Changement hématologique

Une numération formule a été réalisée par le laboratoire en même temps que la PCR pour 33 animaux. L'ensemble des données est regroupé dans le tableau 5.

Tableau 5 : Numération formule des 33 chiens

Numéro de dossier	Hématie (cellules/mm ³)	Hémoglobine (g/L)	Hématocrite (%)	Plaquettes cellules/mm ³)	Leucocytes (cellule/mm ³)
Normes	5500000 à 8500000	12 à 15	37à 45	200000 à 500000	6000 à 17000
121727	7 200 000	17,5	52	350000	10200
125191	5 730 000	13,2	37,4	31000	5320
126304	4 980 000	11,7	33,3	30000	5540
126702	4 240 000	10,3	30,7	80000	3510
131990	4 200 000	9,6	30,1	23000	14100
133602	7 110 000	17,5	55,8	206000	5230
134886	3 880 000	9,5	29,3	20000	5140
136226	5 700 000	13,7	41,3	28000	5350
136300	1 790 000	4,2	11,7	13000	4070
136546	4 580 000	11,2	30,8	28000	3680
136550	5 670 000	13,1	34,5	22000	4000
138877	4 630 000	11,3	35,5	31000	2700
138956	6 050 000	14,7	36,7	456000	5730
142251	5 400 000	12,2	35,4	42000	5630
142355	6 070 000	14,2	34,3	26000	31150
143026	4 560 000	10,5	32,6	280000	12770
144154	5 880 000	11,4	35,4	238000	10960
148117	5 030 000	13,6	39,5	71000	7470
148216	4 100 000	7,4	24,8	79000	5610
149384	6 630 000	16,2	52,2	20000	26230
149575	5 090 000	12,1	37,5	124000	11960
149917	5 490 000	14	38,2	16000	5630
151273	5 580 000	12,8	40,3	33000	4340
152200	3 150 000	7,5	22,9	90000	6530
152201	4 780 000	10,6	32,7	107000	4330
155326	6 420 000	16,5	36,9	176000	11360
157690	4 310 000	11,6	34,2	51000	1247
162139	4 890 000	11,5	33,8	36000	4110
162812	6 130 000	15,9	39,9	17000	13000
166132	5 240 000	13,2	25,1	198000	8950
167814	6 410 000	15	36,4	28000	6200
167903	3 800 000	9,6	25,2	56000	4850
168155	4 510 000	11,3	31,6	39000	13210
Ecart-type	1 141 784	3	8	107 459	6 326
Moyenne	5 010 935	12	34	92 719	8 130

.XII.8.1.Évaluation des paramètres érythrocytaires

Les deux tiers des chiens (20 des 33 animaux) ont un nombre de globules rouges inférieurs aux normes du laboratoire, les 13 autres ont des valeurs dans les normes.

La moyenne du nombre d'érythrocytes par mm^3 de sang du groupe d'animaux est de 5 010 935 ce qui est inférieur à la norme qui est de 5 500 000 par mm^3 de sang. L'écart type est de 1 141 743 érythrocytes par mm^3 de sang. **Le nombre d'érythrocytes des animaux est donc globalement similaire pour tous les chiens et légèrement inférieur aux normes du laboratoire.**

23 des 33 chiens ont un hématoците bas, la moyenne du groupe est de 34% avec un écart type de 8%, leur taux d'hémoglobine est également bas, avec une moyenne à 12g/L et un écart type de 3 g/L. **70% des animaux sont donc anémiés.** Sur ces animaux, seul un présente une anémie sévère (11% d'hématoците et 4,2g/L d'hémoglobine).

Les deux tiers des animaux présentent donc une anémie, ce résultat est en accord avec l'étude réalisée par Furlanello *et al.* en 2005 qui met en évidence une anémie chez 70% de chiens étudiés. Les mécanismes hypothétiques de cette anémie sont soit mécanique, soit à médiation immune ou encore dus à la production de facteurs hémolytiques par le parasite (Onishi *et al.* 1990, Bourdeau et Guelfi 1995). Pour 6 de ces chiens, un test de Coombs a été demandé par le vétérinaire traitant et est positif pour tous ces animaux. Une composante immune est donc fortement probable pour cette anémie même si elle n'est pas le seul mécanisme.

Pour 11 des animaux, un taux de réticulocyte a été mesuré. Six de ces chiens ont une anémie arégénérative et 5 une anémie régénérative. L'absence de régénération de l'anémie de ces 6 chiens est probablement due au stade précoce de l'infection. En effet, la régénération érythrocytaire est visible sur le frottis seulement 6 jours après le début de l'infection (Vercammen *et al.* 1997).

La parasitémie est variable et non corrélée au degré de l'anémie.

Dans cette étude, 2 animaux sont infestés par une *Theileria*. Ils présentent tous deux une anémie arégénérative. Les chiens ont respectivement 4 580 000 et 4 560 000 érythrocytes par mm^3 de sang, 30,8% et 32,6% d'hématoците, et 0,1% et 1% de réticulocytes. Garcia *et al.*

en 2006, décrivent une anémie forte. Sur les numérations formules des 56 chiens étudiées par Garcia *et al.*, tous ont moins de 4 460 000 érythrocytes mm³ de sang et 31% d'hématocrite. Les valeurs observées dans cette étude, correspondent donc aux valeurs observées par Garcia *et al.* 2006.

.XII.8.2.Évaluation du nombre de plaquettes

Sur les 33 numérations formules étudiées, 30 montrent une thrombocytopénie. Cette anomalie est la plus fréquemment retrouvée dans les cas de piroplasmoses (Furlanello *et al.*, 2005). La moyenne du groupe est de 92 719 plaquettes, avec un écart type de 107 459 plaquettes. Cette moyenne est basse, mais il existe une grande variabilité au sein du groupe car l'écart type est important.

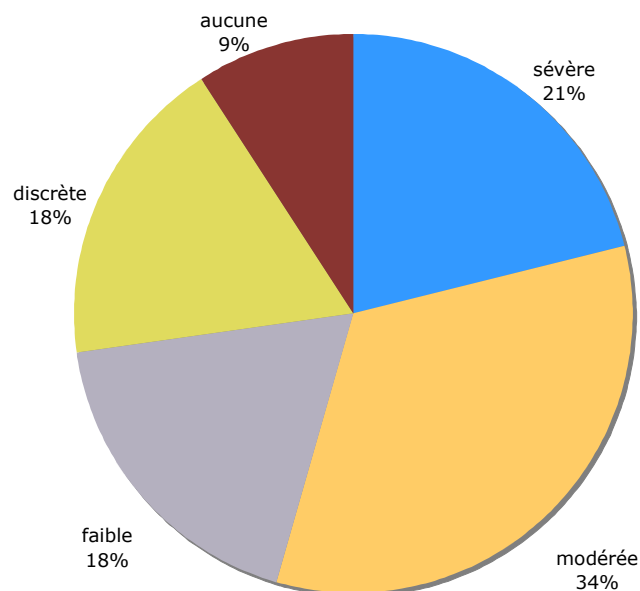
Si on classe la thrombocytopénie en 4 stades : sévère (moins de 24 999 plaquettes par mm³ de sang), modérée (entre 25 000 et 49 999 plaquettes par mm³ de sang), faible (entre 50 000 et 99 999 plaquettes par mm³ de sang) et discrète (entre 100 000 et 199 999 plaquettes par mm³ de sang). 7/33 chiens (21%) ont une thrombocytopénie sévère, 11/33 (34%) une modérée, 6/33 (18%) une discrète, 6/33 (18%) une faible et 3/33 (9%) ont un taux plaquettaire dans les normes usuelles (Figure 28).

Une thrombocytopénie modérée est la plus fréquemment trouvée dans les cas de babesiose canine (Pagès *et al.*, 1990, Bourdeau et Guelfi, 1995). C'est également ce qu'on observe dans cette étude. La diminution du taux plaquettaire est probablement causée par une destruction à médiation immune et une séquestration dans la rate (Furlanello *et al.*, 2005).

L'un des chiens atteint de theileriose présente une thrombocytopénie modérée (28 000 plaquettes par mm³ de sang) tandis que l'autre ne présente pas de thrombocytopénie (280 000 plaquettes par mm³ de sang). Cette observation est en accord avec les résultats de l'étude effectuée par Garcia en 2007, qui met en évidence une thrombocytopénie marquée à moins de 75 000 plaquettes par mm³ de sang chez 75% des animaux.

Figure 28 : Répartition de la thrombocytopénie

Thrombocytopénie sévère (moins de 24 999 plaquettes par mm³ de sang), modérée (entre 25 000 et 49 999 plaquettes par mm³ de sang), faible (entre 50 000 et 99 999 plaquettes par mm³ de sang) et discrète (entre 100 000 et 199 999 plaquettes par mm³ de sang).



.XII.8.3.Evaluation du nombre de leucocytes et de la formule leucocytaire

La moyenne du nombre des leucocyte du groupe est de 8421 cellules par mm³ de sang avec un écart type de 6222 leucocytes par mm³ de sang. L'écart type est très grand ce qui montre une variation importante du nombre de leucocytes au sein du groupe. En effet, 18 des 33 chiens (55%) ont une leucopénie, 2 (3%) ont une leucocytose et 13 (42%) ont un nombre de leucocytes normaux (Tableau 6). Le taux de leucocyte est très variable lors d'une piroplasmose : une leucocytose ou une leucopénie peuvent être observés (Euzéby, 1990), néanmoins l'étude réalisée par Furlanello *et al.* en 2007, montrait également une majorité de chiens leucopéniques.

Tableau 6 : Formule leucocytaire

Numéro de dossier	Leucocyte (cellules/m ³)	Polynucléaire neutrophile	Polynucléaire éosinophile	Polynucléaire basophile	Lymphocyte	Monocyte
Normes	6000-17000	50-68%	2-8%	0%	17-28%	3-8%
121727	10200	65	10	0	21	4
125191	5320	75	1	0	20	4
126304	5540	89	0	0	4	7
126702	3510	68	4	0	17	11
131990	14100	76	0	0	6	18
133602	5230	68	0	0	26	6
134886	5140	88	0	0	4	8
136226	5350	84	0	0	4	12
136300	4070	70	0	0	20	10
136546	3680	80	0	0	9	11
136550	4000	72	0	0	20	8
138877	2700	68	2	0	21	9
138956	5730	98	0	0	2	0
142251	5630	90	1	0	5	4
142355	31150	72	0	0	11	17
143026	12770	64	0	0	32	4
144154	10960	83	3	0	5	9
148117	7470	68	0	0	21	11
148216	5610	60	0	0	29	11
149384	26230	79	0	0	8	13
149575	11960	80	1	0	14	5
149917	5630	83	0	0	7	10
151273	4340	67	0	0	29	4
152200	6530	75	1	0	20	4
152201	4330	80	0	0	13	7
155326	11360	84	1	0	9	6
157690	1247	78	1	0	18	3
162139	4110	68	0	0	15	17
162812	13000	76	5	0	13	6
166132	8950	77	5	0	17	1
167814	6200	65	0	0	2	33
167903	4850	87	0	0	1	12
168155	13210	46	1	0	42	11
Ecart type	6 326	10	2	0	10	6
Moyenne	8 130	73	1	0	14	9

Lorsqu'on étudie la formule leucocytaire de ces chiens, on remarque que 20 des 33 animaux **(60%) présentent une neutrophilie**, un chien (3%) a une neutropénie et 12 chiens (36%) ont un taux de neutrophile dans les normes. 18 chiens **(55%) ont une lymphopénie** et 4 (12%) ont une lymphocytose, 16 **(48%) ont une monocytose**. La neutrophilie est

l'anomalie la plus fréquemment observée ce qui avait également été le cas dans l'étude de Furlanello *et al.* en 2007.

Les chiens infestés par *Theileria* ont des taux de leucocytes très différents : l'un présente une leucopénie (3680 leucocytes par mm^3 de sang) et l'autre un taux de leucocyte normal (12770 leucocyte par mm^3 de sang). L'étude réalisée par Garcia en 2007 montre également une grande variabilité du nombre de leucocytes.

XII.9.Frottis sanguin

Pour ces 33 numérations formules, un frottis a également été réalisé. Deux lots d'animaux peuvent être distingués : un premier pour lequel le frottis n'a pas mis en évidence de parasite (frottis négatif) mais où la PCR a détecté le piroplasme, et un second où le frottis et la PCR ont mis en évidence le piroplasme. Les résultats obtenus pour les deux groupes sont indiqués dans le tableau 7.

Sur l'ensemble des prélèvements sanguins étudiés, 5 frottis n'ont pas détecté de parasite.

La moyenne du nombre d'hématie par mm^3 des animaux ayant un frottis négatif se situe dans la limite inférieure des normes usuelles alors que celle des animaux ayant un frottis positif se situe sous cette norme. Il en est de même pour l'hémoglobine et l'hématocrite. Les deux lots d'animaux présentent une thrombocytopénie, qui est plus marquée pour les animaux ayant un frottis positif. La moyenne du nombre de leucocyte par mm^3 est également plus élevée pour les animaux ayant un frottis négatif. Néanmoins, l'écart type est important dans chacun de ces lots. On réalise un test de Student pour comparer ces deux lots avec un risque d'erreur de 5%, c'est-à-dire qu'on considère que les échantillons sont différents avec moins de 5% de chance de se tromper si $p < 0,05$.

Ce test ne montre pas de différence significative entre le nombre d'hématie ($p = 0,617$), de plaquettes ($p = 0,288$) ainsi que le taux d'hémoglobine ($p = 0,126$) et d'hématocrite ($p = 0,686$) entre les animaux avec un frottis positif et ceux ayant un frottis négatif. La seule différence significative existe entre le nombre de leucocytes ($p = 0,0003$) : les chiens avec un frottis négatif ont une leucocytose alors que ceux à frottis positif ont une leucopénie.

Quatre animaux sur les 5 chiens ayant un frottis négatif présentent une thrombocytopénie, seuls deux animaux ont un hémocrite inférieur à la norme du laboratoire, et un seul présente un taux d'hémoglobine et un nombre d'hématies inférieur aux normes du laboratoire. **La thrombocytopénie est donc la modification sanguine la plus fréquente en cas de frottis négatif.**

Tableau 7 : Valeur de la numération formule suivant la présence ou non de piroplasme sur le frottis

Frottis	Numéro de dossier	Hématie (cellules/mm ³)	Hémoglobine (g/L)	Hématocrite (%)	Plaquettes (cellules/mm ³)	Leucocytes (cellule/mm ³)
Négatif	142355	6 070 000	14,2	34,3	26000	31150
	149384	6 630 000	16,2	52,2	20000	26230
	155326	6 420 000	16,5	36,9	176000	11360
	166132	5 240 000	13,2	25,1	198000	8950
	143026	4 560 000	10,5	32,6	280000	12770
	Moyenne	5 784 000	14	36	140 000	18 092
	Ecart type	865 465	2	10	113 640	9 924
Positif	121727	7 200 000	17,5	52	350000	10200
	125191	5 730 000	13,2	37,4	31000	5320
	126304	4 980 000	11,7	33,3	30000	5540
	126702	4 240 000	10,3	30,7	80000	3510
	131990	4 200 000	9,6	30,1	23000	14100
	133602	7 110 000	17,5	55,8	206000	5230
	134886	3 880 000	9,5	29,3	20000	5140
	136226	5 700 000	13,7	41,3	28000	5350
	136300	1 790 000	4,2	11,7	13000	4070
	136550	5 670 000	13,1	34,5	22000	4000
	138877	4 630 000	11,3	35,5	31000	2700
	138956	6 050 000	14,7	36,7	456000	5730
	142251	5 400 000	12,2	35,4	42000	5630
	144154	5 880 000	11,4	35,4	238000	10960
	148117	5 030 000	13,6	39,5	71000	7470
	148216	4 100 000	7,4	24,8	79000	5610
	149575	5 090 000	12,1	37,5	124000	11960
	149917	5 490 000	14	38,2	16000	5630
	151273	5 580 000	12,8	40,3	33000	4340
	152200	3 150 000	7,5	22,9	90000	6530
	152201	4 780 000	10,6	32,7	107000	4330
	157690	4 310 000	11,6	34,2	51000	11247
	162139	4 890 000	11,5	33,8	36000	4110
	162812	6 130 000	15,9	39,9	17000	13000
	167814	6 410 000	15	36,4	28000	6200
	167903	3 800 000	9,6	25,2	56000	4850
	168155	4 510 000	11,3	31,6	39000	13210
	136546	4 580 000	11,2	30,8	28000	3680
	Moyenne	5 011 071	12	35	83 750	6 773
	Ecart type	1 157 694	3	8	106 186	3340

XII.10.Conclusion de l'étude

La moyenne de l'âge des chiens de l'étude est de 5 ans, avec 60% de mâles pour 30% de femelles. La répartition du nombre de PCR sur l'année est calquée sur la période d'activité de *Dermacentor reticulatus*. Les PCR mettant en évidence une *Theileria*, ont une répartition annuelle différente, avec un pic durant l'hiver, ce qui laisse penser qu'elles sont véhiculées par un autre vecteur que *Dermacentor reticulatus*.

La répartition géographique des chiens ayant eu une PCR positive est calquée sur la répartition des piroplasmes. Quelques zones sont dépourvues de résultats, ce qui peut soit être dû à une absence de cas soit au travail de la clinique avec un autre laboratoire plus proche. Il semble y avoir 3 foyers de *Theileria*, un premier dans la région parisienne, un second dans la région lyonnaise et un troisième dans la région bordelaise.

Le piroplasme le plus trouvé lors des PCR est *Babesia canis canis* (84% des chiens) et les animaux ont souvent une forte charge parasitaire. Le second parasite trouvé est *Theileria*, une *Babesia canis rossi* a été isolée chez un chien qui voyage. Quelques co-infections ont été décelées (*Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Leishmania*, *Bartonella*), la charge parasitaire était faible pour chaque prélèvement.

Babesia canis canis engendre une anémie chez 70% des animaux, le test de Coombs est positif à chaque demande. Une thrombocytopénie est décelée dans 80% des cas, elle est le plus souvent modérée. Le taux de leucocyte est variable, on observe soit une leucocytose, soit une leucopénie. Chez 60% des animaux, une neutrophilie est observée.

Theileria est responsable d'une anémie forte, avec ou sans thrombocytopénie. Le nombre de leucocyte est également variable.

XIII. Intérêt de la PCR pour quelques cas cliniques.

XIII.1. Cas clinique numéro 1 : bichon femelle non stérilisée née en 2001

XIII.1.1. Anamnèse

Les antécédents de cet animal ne sont pas connus.

La chienne est présentée la première fois à la clinique **le 28 juillet 2005** car une plaque érythémateuse et suintante est apparue sur son flanc gauche. Une piqûre d'insecte est alors suspectée et un traitement symptomatique à base d'antibiotique et d'anti-inflammatoire est alors entrepris. Les lésions disparaissent.

Le 20 octobre 2005, la chienne revient à la clinique. Elle est agitée et présente des ecchymoses sur le ventre qui semblent être dues à des piqûres de puces.

Elle est normotherme et les paramètres vitaux sont dans les normes usuelles.

Le vétérinaire suspecte alors un trouble de l'hémostase. Une numération formule est réalisée sur l'automate de la clinique, et met en évidence une thrombocytopénie à 30 000 plaquettes par mm³. Le temps de Quick est normal. Les dosages phosphatases alcalines ainsi que des transaminases sont dans les valeurs usuelles.

Les lésions cutanées sont traitées localement par de la prédnisolone (Pruritex ND).

Le 25 octobre 2005, la chienne revient à la clinique pour dysorexie et plaintes aiguës depuis 48 heures. Les ecchymoses sur le ventre ont disparu.

Elle est normotherme, ne présente pas d'adénomégalie, la palpation abdominale est souple et non douloureuse. Le vétérinaire décide alors de placer l'animal sous prednisolone par voie orale 1mg/kg/j pendant 6 jours puis 0,5 mg/kg/j pendant 15 jours. L'état de l'animal s'améliore rapidement.

Le **17 décembre 2005**, la chienne revient pour la réalisation d'une nouvelle numération formule afin de réévaluer la thrombocytopénie observée en octobre. La thrombocytopénie est de nouveau confirmée à 78 000 plaquettes par mm³. Afin de s'affranchir d'erreur de l'automate de la clinique, une numération formule est aussi envoyée à un laboratoire extérieur qui la confirme.

Au vue de l'évolution clinique, l'hypothèse d'une thrombocytopénie à médiation auto immune est envisagée. Aucun traitement n'est envisagé car la chienne n'est pas symptomatique.

.XIII.1.2.Motif de consultation

Le 26 avril 2006, la chienne est présentée à la clinique pour **hyporexie depuis une semaine**.

.XIII.1.3.Examen clinique

La chienne ne présente pas d'hyperthermie (38,5°C), les muqueuses sont un peu pâles. Tous les paramètres vitaux évalués sont dans les normes usuelles.

.XIII.1.4.Examens complémentaires

XIII.1.4.1.Bilan biochimique

Un bilan biochimique complet ne montre aucune anomalie (Annexe 2).

XIII.1.4.2.Numération formule

A cause de la thrombocytopénie diagnostiquée en décembre 2005 et la pâleur des muqueuses, une numération formule est réalisée le 24 avril. Le laboratoire met en évidence **une anémie et une thrombocytopénie** (Annexe 2).

XIII.1.4.3.Test de Coombs

Le vétérinaire soupçonne fortement une origine immune à cette anémie et à cette thrombocytopénie. Pour explorer cette hypothèse, il réalise un test de Coombs. Ce test est

positif au 128^{ème} (le seuil de positivité du laboratoire étant de 8). **Il conclut alors à une anémie et une thrombocytopénie auto immune.**

.XIII.1.5.Traitement

La chienne reçoit alors de la prednisolone à **3 mg/kg par jour** donnée en deux prises **pendant dix jours puis un jour sur deux pendant une semaine.**

.XIII.1.6.Evolution clinique

XIII.1.6.1.Contrôle le 12 mai

La chienne s'améliore. Une numération formule de contrôle réalisée 15 jours après le début du traitement montre une disparition de l'anémie. Le vétérinaire diminue donc la dose à 0,2 mg/kg tous les deux jours durant quinze jours puis tous les trois jours pendant quinze jours (Annexe 2).

Après une semaine de traitement, la chienne redevient hyporexique. Les doses de prednisolone sont alors augmentées jusqu'à 0,5 mg/kg tous les deux jours. La chienne s'améliore puis rechute lors de la diminution des doses de corticoïdes.

XIII.1.6.2.Contrôle le 10 juin

Une nouvelle numération formule, réalisée le 10 juin, montre une anémie régénérative et une neutrophilie mais pas de thrombocytopénie. Un test de Coombs est un nouveau réalisé et est encore positif (Annexe 2).

Deux hypothèses sont alors émises : l'anémie est-elle auto immune ou à médiation immune ? Les vétérinaires réalisent alors une PCR pour rechercher un piroplasma.

La PCR met en évidence *B. canis canis*. Julie reçoit alors **deux injections d'imidocarbe à trois semaines d'intervalle à 3 mg/kg** et la **prednisolone** est maintenue à **1 mg/kg/j.**

L'animal s'améliore nettement, une nouvelle PCR est réalisée un mois plus tard pour rechercher d'éventuels piroplasmes et est négative. Une nouvelle numération formule est

également faite par le laboratoire et ne met plus en évidence d'anémie (Annexe 2). Les corticoïdes sont alors diminués progressivement et l'état général de la chienne reste bon.

.XIII.1.7.Discussion

Ce cas montre le **polymorphisme des symptômes de la piroplasmose**. Dans ces cas chroniques d'anémie, la **charge parasitaire est souvent faible, les parasites ne sont pas toujours visibles sur un frottis et seule la PCR est assez sensible pour les détecter**. Il est alors important de chercher une cause parasitaire à cette anémie et cette thrombocytopénie à médiation immune, afin de ne pas incriminer à tort un dysfonctionnement immunitaire primaire.

XIII.2.Cas clinique numéro 2 : cavalier king charles mâle, non castré, né en 2002

.XIII.2.1.Motif de consultation

Le chien est présenté à la clinique pour anorexie, abattement et dorsalgie le 2 mai 2006.

.XIII.2.2.Anamnèse

Le chien n'a aucun antécédent pathologique. Son statut vaccinal n'est pas connu.

.XIII.2.3.Examen clinique

Il ne présente pas d'hyperthermie, ni d'adénopathie et il n'est pas déshydraté. Les muqueuses sont pâles, l'animal est essoufflé, mais l'auscultation du champ pulmonaire est normale. La palpation abdominale est souple et une discrète splénomégalie est notée.

.XIII.2.4.Examens complémentaires

XIII.2.4.1.Radiographie

Pour explorer l'essoufflement, une radiographie du thorax est réalisée et ne montre pas d'anomalie.

XIII.2.4.2.Examen biochimique

Un bilan biochimique est réalisé et se relève normal.

XIII.2.4.3.Numération formule

La pâleur des muqueuses est en faveur d'une anémie qui est explorée par une numération formule réalisée sur l'automate de la clinique.

Elle montre une **anémie majeure, associée à une thrombocytopénie** ainsi qu'une **leucopénie modérée** (Annexe 3).

XIII.2.4.4.Analyse d'urine

Afin d'explorer l'origine de l'anémie une analyse d'urine est effectuée. Elle montre une **protéinurie, une bilirubinurie ainsi qu'une hémoglobinurie**. L'animal présente donc une hémolyse.

Pour caractériser l'anémie une seconde numération formule ainsi qu'un frottis sont demandés au laboratoire C.A.L.

La numération formule est en faveur d'une **anémie macrocytaire, normochrome arégénérative associée à une lymphopénie et une thrombocytopénie**. La lecture du frottis révèle quelques rares piroplasmes. Une PCR-RFLP permet d'identifier *B. canis canis* (Annexe 3).

.XIII.2.5.Traitement

Le chien reçoit de l'**imidocarbe à dose de 3 mg/kg** en une injection unique sous cutanée. Il est perfusé durant 24 heures.

Un **traitement antibiotique** est ensuite mis en place *per os* durant une semaine associé à des **corticoïdes à dose de 1mg/kg/jour la première semaine puis un jour sur deux la seconde.**

.XIII.2.6.Evolution clinique

Suite au traitement, l'animal s'améliore très rapidement mais rechute trois semaines plus tard : il présente de nouveau un abattement et une dysorexie.

Une nouvelle numération formule est envoyée au C.A.L, **le 26 mai**. L'anémie est alors macrocytaire normochrome et régénérative. La thrombocytopénie est toujours présente.

Le frottis ne montre plus de piroplasme mais la PCR réalisée sur l'échantillon sanguin détecte une forte charge parasitaire, le piroplasme isolé est encore *B. canis canis*.

Le chien reçoit alors **deux injections sous cutanée à 3 mg/kg d'imidocarbe à 8 jours d'intervalle.**

Il s'améliore mais la PCR réalisée **le 15 juin** met de nouveau en évidence *B. canis canis*. Il est alors traité par une **injection d'imidocarbe à 3 mg/kg associée à 10 jours de chlorydrate de quinine à 8 mg/kg *per os* trois fois par jour et de la clindamycine à 12 mg/kg *per os* matin et soir.** Le chien s'améliore alors.

Le chien connaît alors un épisode de rechute **le 12 octobre**, où *Babesia canis canis* est encore détectée mais à faible charge, il reçoit à nouveau le même traitement. **Le 24 janvier** il rechute de nouveau mais cette fois, la PCR-RFLP met en évidence un piroplasme du genre *Theileria*, le même traitement est alors effectué et soulage l'animal.

.XIII.2.7.Discussion

Le chien voyage régulièrement en Turquie ; son suivi est donc difficile par le vétérinaire traitant. Aucune donnée concernant la prévention anti-tiques de ce chien n'est connue, il est alors impossible de savoir si le chien se réinfeste ou si l'élimination du parasite est inefficace. Néanmoins, l'isolement d'un autre type de piroplasme laisse penser que le chien a été de nouveau contaminé entre le mois de septembre et le mois d'octobre.

L'intérêt de la PCR dans ce cas clinique est de mettre en évidence un parasite qui n'est pas détectable sur le frottis et ainsi de pouvoir traiter la cause de l'anémie et de la thrombocytopénie. **Elle permet aussi de suivre l'efficacité du traitement et de la charge parasitaire.**

XIII.3.Cas clinique numéro 3 : westie mâle non castré, né en 2002

.XIII.3.1.Anamnèse

Ce chien a été présenté dans une clinique située en Charente, peu après son arrivée dans le département. Il présentait un **abattement et une hyperthermie**. Le vétérinaire qui a diagnostiqué une piroplasmose l'a traitée avec une injection d'imidocarbe à 3 mg/kg.

.XIII.3.2.Motif de consultation

Trois jours plus tard, le 11 juin 2006, son état ne s'améliore pas et le chien est présenté dans une autre clinique vétérinaire.

.XIII.3.3.Examen clinique

Le chien est abattu, les muqueuses sont pâles, la température est de 38,7°C. La palpation abdominale est souple et non douloureuse. Les paramètres vitaux sont dans les normes usuelles.

.XIII.3.4.Examens complémentaires

XIII.3.4.1.Frottis sanguin

La vétérinaire réalise alors un **frottis qui met en évidence des piroplasmes**. L'animal est de nouveau traité avec de **l'imidocarbe à 3 mg/kg**. Le 18 juin, il est revu en contrôle à la clinique, son état s'est nettement amélioré mais des piroplasmes sont encore visibles sur le frottis.

XIII.3.4.2. Numération formule

Pour conforter son diagnostic, la vétérinaire envoie un prélèvement sanguin dans un laboratoire extérieur afin de réaliser un nouveau frottis et une numération formule. L'animal présente une leucocytose (27 000 globules blancs par mm³), une anémie modérée (hématocrite 32%) ainsi qu'une thrombocytopénie à 73 000 plaquettes par mm³. Le frottis réalisé par le laboratoire met aussi en évidence des piroplasmes. Le chien est de **nouveau traité avec de l'imidocarbe à la même dose que précédemment.**

XIII.3.4.3. Test de Coombs

Un test de Coombs est ensuite réalisé le 26 juin car le chien s'est amélioré mais est toujours légère abattu et hyporexique. Il se révèle positif (au 1/512^{ème} pour les IgG).

XIII.3.5. Traitement

Le chien est alors placé sous **prednisolone** (Dermipred N.D.) à dose immunosuppressive (2mg/kg/j).

XIII.3.6. Evolution clinique

Le **07 juillet**, il est revu à la clinique. Son état s'est nettement amélioré sous prednisolone même si la propriétaire note toujours des fluctuations de l'état général de son chien. Une numération formule de contrôle est réalisée et montre une **normalisation du taux plaquettaire.**

Le **25 juillet**, le chien est à nouveau présenté. Les muqueuses sont **pâles, il est abattu et en hyperthermie.** Une bandelette urinaire révèle une **protéinurie massive.** Une nouvelle numération formule montre une **anémie macrocytaire normochrome régénérative et une thrombocytopénie** (Annexe 4). La diminution du taux de plaquettes et de globules rouges ainsi que la leucocytose modérée pousse la vétérinaire à rechercher une autre origine à cette anémie.

Une recherche de *Rickettsia*, *Neorickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Bartonella* et *Babesia* est alors demandée au laboratoire C.A.L (Annexe 4).

***Bartonella* spp. a été détectée et une faible charge de *Babesia* spp. également.** Le typage de babésia a mis en évidence *B. canis canis*.

Le chien reçoit de nouveau une injection d'**imidocarbe** à 3 mg/kg et de la **doxycycline** (Doxyval N.D.) à 10 mg/kg durant quinze semaines, les **corticoïdes** à dose immunosuppressive sont poursuivis.

A l'issue de ce traitement, le **30 juillet**, une nouvelle PCR est réalisée : elle ne détecte pas de piroplasma mais encore quelques bartonelles. Le traitement est donc poursuivi durant 10 jours supplémentaires.

Le **02 août**, une nouvelle numération formule est réalisée et est conforme aux valeurs usuelles. Les propriétaires diminuent progressivement les corticoïdes jusqu'à arrêter le traitement fin août. Un contrôle téléphonique début septembre a été réalisé, les propriétaires trouvent le chien en pleine forme et au moment de la rédaction de cette thèse, il n'a pas été de nouveau présenté à la clinique.

.XIII.3.7.Discussion

Ce cas montre l'intérêt de réaliser une PCR, lors **d'infections chroniques** qui sont difficiles à traiter. Elle permet de suivre la charge parasitaire et de contrôler le « blanchiment » de l'animal. De plus, elle apporte un soutien au vétérinaire traitant en identifiant et en quantifiant le parasite.

L'utilisation de PCR pour identifier plusieurs parasites a permis de mettre en évidence une **infestation concomitante de plusieurs agents pathogènes** qui semblent responsables de l'inefficacité du traitement. Seule la lutte concomitante contre les deux pathogènes est efficace.

XIII.4.Cas clinique numéro 4 : chienne schnauzer, stérilisée, née en 1997

.XIII.4.1.Anamnèse

La chienne est vaccinée depuis l'âge d'un an, tous les ans, avec un vaccin contre la piroplasmose (Pirodog N.D.). Elle est également vaccinée contre l'hépatite de Rubarth, la parvovirose, la maladie de carré, la leptospirose et la rage tous les ans. Elle est stérilisée depuis ses deux ans et souffre d'otites chroniques récidivantes.

.XIII.4.2.Motif de consultation

Le 21 septembre 2007, elle est présentée à la clinique car elle est très **abattue**. Une tique a été retirée la veille par son propriétaire.

.XIII.4.3.Examen clinique

La chienne est abattue, les muqueuses sont roses, la palpation abdominale est souple et non douloureuse. La température est de 38,8°C, la fréquence cardiaque et la fréquence respiratoires sont dans les normes usuelles.

.XIII.4.4.Examens complémentaires

Le retrait d'une tique la veille pousse la vétérinaire à réaliser un frottis en premier lieu. Il ne met pas en évidence de piroplasmes.

XIII.4.4.1.Numération formule

Une numération formule ne montre **pas d'anémie ni de thrombocytopénie**. Le taux de leucocytes et la formule leucocytaire sont également dans les normes du laboratoire.

XIII.4.4.2.Examen biochimique

Un bilan biochimique met en évidence une augmentation modérée de l'urémie à 0,60g/L et de la créatininémie à 22,3 mg/L (Annexe 5).

XIII.4.4.3.Échographie abdominale

Une échographie abdominale est ensuite effectuée, elle ne montre pas d'anomalie.

.XIII.4.5.Traitement

Une injection d'**imidocarbe** est effectuée à **3 mg/kg** ainsi qu'une injection d'**amoxicilline (Clamoxyl L.A N.D)** à **20 mg/kg**. La chienne est ensuite mise sous perfusion pour traiter son insuffisance rénale.

Le laboratoire extérieur réalise également un frottis qui ne montre aucun parasite et conseille de réaliser une PCR.

Une PCR est alors demandée au C.A.L qui détecte ***Babesia* en forte charge**.

L'animal est alors traité par deux injections d'imidocarbe à dose préventive à **6 mg/kg à trois semaines d'intervalle**.

.XIII.4.6.Evolution clinique

L'état de la chienne s'est nettement amélioré. Elle est revenue depuis à la clinique pour sa vaccination annuelle et se porte bien.

.XIII.4.7.Discussion

Ce cas montre **l'intérêt de la vaccination qui atténue l'expression clinique de la piroplasmose**. En effet, la chienne présentée ici est peu hypertherme et sa numération formule sanguine n'est pas modifiée. Mais cette vaccination rend plus difficile la détection du parasite. Les frottis réalisés sont souvent négatifs et nous poussent à conclure à tort à une absence de parasite. L'analyse par PCR, est alors un outil intéressant pour détecter les parasites.

De plus, ce cas met en évidence la difficulté à blanchir l'animal grâce à une seule injection de Carbésia N.D. et la nécessité de réaliser des protocoles plus agressifs pour venir à bout de certains parasites.

XIII.5.Cas clinique numéro 5 : chienne croisée non stérilisée, née en 2001

.XIII.5.1.Anamnèse

Chienne sans antécédent pathologique connu, correctement vaccinée tous les ans contre la maladie de carré, l'hépatite de Rubarth, la leptospirose la parvovirose et la rage.

.XIII.5.2.Motif de consultation

La chienne est présentée le 23 juillet 2007 pour abattement brutal.

.XIII.5.3.Examen clinique

La chienne est abattue, ses muqueuses sont pâles, son temps de recoloration capillaire est inférieur à deux secondes. Elle présente un souffle systolique apexien gauche d'intensité 3/6. La chienne ne présente pas d'hyperthermie.

.XIII.5.4.Examens complémentaires

XIII.5.4.1.Numération formule et frottis sanguin

Le vétérinaire décide d'explorer la pâleur des muqueuses, pour cela il réalise une numération formule et un frottis. Elle met en évidence une **anémie sévère** (le taux d'hémoglobine est de 4,6 g/l et le taux d'hématocrite de 16%). Elle est peu régénérative.

Le frottis ne met en évidence aucun piroplasma.

Le sérum est ictérique.

XIII.5.4.2.Examen urinaire

Une bandelette urinaire est réalisée et met en évidence une **protéinurie**.

XIII.5.4.3.Temps de coagulation

Des temps de coagulation sont aussi réalisés et sont dans les normes.

XIII.5.4.4.Échographie abdominale

Les hypothèses retenues à ce moment sont celles d'une anémie hémolytique ou d'un saignement en cours de résorption. Pour explorer un éventuel saignement, une échographie abdominale est réalisée. Elle met en évidence une splénomégalie sans modification morphologique ni échogénique ainsi qu'un utérus polykystique. Aucun saignement n'est détecté.

XIII.5.4.5.Test de Coombs

Afin de rechercher le mécanisme de l'anémie, un test de Coombs est alors réalisé et est faiblement positif.

XIII.5.4.6.PCR

L'hypothèse la plus probable est alors celle d'une anémie à médiation immune. Des tests PCR recherchant *Leptospira interrogans*, *Leishmania infantum*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* et *Babesia* sont alors demandées.

.XIII.5.5.Traitement

En attendant les résultats, la chienne est hospitalisée, mise sous perfusion, antibiotiques et sous Dexadreson N.D. à dose anti inflammatoire (0,5 mg/kg/j).

.XIII.5.6.Evolution clinique

Le 25 juillet, la chienne s'améliore, elle retrouve l'appétit et une nouvelle numération formule montre une diminution de l'anémie (le taux d'hémoglobine est remonté à 6,2 g/l et le taux d'hématocrite à 21%). La chienne rentre alors chez elle avec de la methylprednisolone (Oromédrol N.D.) à 0,3 mg/kg par jour et de la cefalexine (Rilexine N.D.) à 15 mg/kg matin et soir en attendant les résultats de la PCR.

Le 28 juillet, les résultats de la PCR montrent la présente de *Babesia canis canis* à **faible charge**, les autres parasites recherchés ne sont pas présents (Annexe 6). La chienne est alors traitée par de l'imidocarbe à dose préventive c'est à dire à 6 mg/kg, deux fois à quinze jours d'intervalle.

La chienne s'est ensuite nettement améliorée. Elle est revenue à la clinique 6 mois plus tard pour une ovario-hystérectomie pour retirer son utérus polykystique. L'intervention s'est bien passée.

.XIII.5.7.Discussion

Ce cas illustre, la **difficulté à détecter les piroplasmes même en cas d'anémie très marquée et brutale**. L'anémie de la chienne a régressé avant l'injection de Carbesia ND, ce qui peut fausser le diagnostic du vétérinaire.

XIII.6.Conclusion

L'ensemble des cas cliniques prouve l'intérêt de la PCR pour la détection mais aussi pour le suivi de la piroplasmose du chien.

Tout d'abord, elle trouve toute son importance dans le diagnostic de la maladie. En effet, au travers du cas numéro 1, on comprend l'intérêt de cet outil pour rechercher le parasite qui n'est pas détectable par les méthodes usuelles lorsqu'il se trouve en faible charge. Ce qui peut être le cas lors d'anémie hémolytique à médiation immune par exemple.

Par le biais du cas numéro 4, on remarque que la PCR est aussi un outil pour mettre en évidence un parasite chez un chien vacciné présentant un tableau clinique atypique.

Ensuite, elle occupe une place importante dans le suivi des animaux atteints, car pour certains, le traitement avec des doses usuelles d'imidocarbe ne suffit pas et le parasite persiste. La PCR permet de suivre la charge parasitaire de l'animal durant le traitement jusqu'à garantir une élimination totale du parasite.

Enfin, en association avec d'autre PCR, elle permet de détecter des co-infections parasitaires qui sont responsables de modifications du tableau clinique du chien, assombrissent le pronostic et compliquent le traitement.

Conclusion générale

La piroplasmose est une maladie transmise aux chiens par les tiques, elle est causée par la multiplication dans les hématies de protozoaires du genre *Babesia* ou *Theileria*. L'absence de signe clinique pathognomonique et la présence de manifestations cliniques atypiques rend son diagnostic difficile pour le clinicien.

La première partie de cette thèse a mis en évidence une meilleure sensibilité et la spécificité de la PCR par rapport aux autres techniques de mise en évidence du parasite.

Les données accompagnant 75 cas de PCR positives réalisées par le laboratoire C.A.L entre le 15 mars 2006 et le 4 janvier 2008 ont révélé une prédominance de *Babesia canis canis* (84%) mais aussi la présence de *Theileria spp.* pour certains prélèvements (12%). La répartition annuelle du nombre de PCR identifiant *Babesia canis canis* correspond à la période d'activité de *Dermacentor reticulatus*, par contre les PCR détectant une *Theileria* semblent plus nombreuses l'hiver, ce qui laisse penser qu'un vecteur différent dissémine ces piroplasmes. Les départements ayant eu le plus de PCR positives pour *Babesia canis canis*, sont ceux pour lesquels la prévalence de la maladie est élevée. Trois foyers de *Theileria* sont isolés par cette étude. La thrombocytopénie est la modification hématologique la plus fréquemment observée pour les deux genres de parasites (80% des cas), vient ensuite l'anémie (70% des cas) et la neutrophilie (60% des cas).

L'étude de 5 cas présentant un tableau clinique atypique de piroplasmose souligne l'intérêt de la PCR pour le clinicien afin de détecter et de suivre cette parasitose.

Bibliographie

- [1] ALHASSAN A, THEKISOE OM, YOKOYAMA N, INOUE N, MOTLOANG MY, MBATI PA, YIN H, KATAYAMA Y, ANZAI T, SUGIMOTO C, IGARASHI I. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmosis. *Veterinary Parasitology*, 2007, **143**, 155-160.
- [2] ANO H, MAKIMURA S, HARASAWA R. Detection of *Babesia* species from infected dog blood by polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2001, **63**(1), 111-113.
- [3] BANETH G, KENY MJ, TASKER S, ANUG Y, SHKAP V, LEVY A, SHAW SE. Infection with a proposed new subspecies of *Babesia canis*, *Babesia canis* subsp. *presentii*, in domestic cats. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, **42**(1), 99-105.
- [4] BIRKENHEUER AJ, LEVY MG, BREITSCHWERDT EB. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, **41**(9), 4172-4177.
- [5] BIRKENHEUER AJ, NEEL J, RUSLANDER D, LEVY MG, BREITSCHWERDT EB. Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. *Veterinary Parasitology*, 2004, **124**, 151-160.
- [6] BÖHM M, LEISEWITZ AL, THOMPSON PN, SCHORMAN JP. Capillary and venous *Babesia canis rossi* parasitaemias and their association with outcome of infection and circulatory compromise. *Veterinary Parasitology*, 2006, **141**, 18-29.

- [7] BOOZER AL, MACINTIRE DK. *Babesia gibsoni* : An emerging pathogen in dogs. *Compendium*, 2005, **27**(1), 33-42.
- [8] BOOZER AL, MACINTIRE DK. Canine babesiosis. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, 2003, **33**, 885-904.
- [9] BOURDEAU P, GUELFJ JF. [La babésiose canine à *Babesia canis*](#). *Le Point Vétérinaire*, 1995, **27**(168), 103-116.
- [10] BOURDOISEAU G, HUGNET C. Les babésioses canines, identité et interrogations. *Le Nouveau Praticien Vétérinaire*, 2005, **287**, 19-23.
- [11] BOURDOISEAU G, RENARD N. Résultats d'une enquête en France sur les cas suspectés ou confirmés de babésiose chez le chien. *Le Nouveau Praticien Vétérinaire*, 2005, **305**, 37-42.
- [12] BUSSIERAS J. Pathogénie des babesioses. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*, 1990, **25** (5), 511-521.
- [13] BUSSIERAS J, CHERMETTE R. *Abrégé de parasitologie vétérinaire. Fascicule II Protozoologie vétérinaire*. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique de parasitologie, 1992, 186p.
- [14] BUSSIERAS J, CHERMETTE R. *Abrégé de parasitologie vétérinaire. Fascicule IV Entomologie vétérinaire*. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique de parasitologie, 1991, 163p.
- [15] BUSTIN SA. Absolute quantification of mRNA using real- time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2000, **25**: 169-193.
- [16] CACCIO SM, ANTUNOVIC B, MORETTI A, MANGILI V, MARINCULIC, BARIC RR *et al*. Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. *Veterinary Parasitology*, 2002, **106**, 285-292.

- [17] CAMACHO AT, GUITIAN FJ, PALLAS E, GESTAL JJ, OLMEDA S, GOETHERT H *et al.* Azotemia and mortality among *Babesia microti*-like Infected dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2004, **18**, 141-146.
- [18] CAMACHO AT, GUITIAN FJ, PALLAS E, GESTAL JJ, OLMEDA S, GOETHERT H *et al.* Serum protein response and renal failure in canine *Babesia annae* infection. *Veterinary Research*, 2005, **36**, 713-722.
- [19] CAMACHO AT, PALLAS E, GESTAL JJ, GUITIAN FJ, OLMEDA AS, STELFORD III SR, SPIELMAN A. *Ixodes hexagonus* is the main candidate as vector of *T. annae* in Northwest Spain. *Veterinary Parasitology*, 2003, **112**, 157-163.
- [20] CRIADO A, MARTINEZ J, BULING A, BARBA JC, MERINO S, JEFFERIES R, IRWIN PJ. New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome *b* genes. *Veterinary Parasitology*, 2006, **142**, 238-247.
- [21] CRIADO-FORNELIO A, MARTINEZ-MARCOS A, BULING-SARANA A, BARBA-CARRETERO JC. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe Part I. epizootiological aspects. *Veterinary Parasitology*, 2003, **113**, 189-201.
- [22] CRIADO-FORNELIO A, REY-VALEIRON C, BULING A, BARBA-CARRETERO JC, JEFFERIES J, IRWIN P, New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. *Veterinary Parasitology*, 2007, **144**, 261-269.
- [23] DAVID F, TURLOTTE E. Une méthode d'amplification génétique isotherme. *Academy Science*, 1998, **321**, 904-314.
- [24] DORCHIES Ph. Les phénomènes immunitaires dans la piroplasmose du chien. *Animal de compagnie*, 1974, **2**, 177-182.

- [25] EUZEBY J. *Protozoologie médicale comparée, Vol III, Apicomplexa 2 : hemosporidiose Fascicule 1 : Plasmodiidés, Haemoprotéidés « piroplasme » (caractère généraux)*. Collection Fondation Marcel Mérieux, 1988, 558p.
- [26] FURLANELLO T, FIORIO F, CALDIN M, LUBAS G, SOLANO GALLEGU L. Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesioses caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. *Veterinary Parasitology*, 2005, **134**, 77-85.
- [27] GARCIA AT. *Piroplasma* infection in dogs in northern Spain. *Veterinary Parasitology*, 2006, **138** (1-2), 97-102.
- [28] GRAB JD, LONSDALE-ECCLE J, INOUE N. LAMP for tadpoles. *Natural Methods*, 2005, **2**, 635.
- [29] GUELFU JF, CANDEBAT D. Haematological modifications in spontaneous canine babesiosis. *Proceedings of the International Society of Animal Clinical Biochemistry*, 1998, 160.
- [30] GUITAN FJ, CAMACHO AT, TELFORD III SR. Case-control study of canine infection by a newly recognised *Babesia microti*-like piroplasm. *Preventive Veterinary Medicine*, 2003, **61**, 137-145.
- [31] HARTELT K, RIEKER T, OEHME RM, BROCKMANN SO, MULLER W. First evidence of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) in dogs in Western Europe. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, 2007, **7**(2), 163-166.
- [32] HEYMAN P, DUH D, VAN DER KUYLEN B, COCHEZ C, VAN ESBROECK M, VANDENVELDE C, AVSIC-ZUPANC T. Molecular and serological evidence for *Anaplasma platys* and *Babesia* sp. infection in a dog, imported in Belgium, from Southern

Spain. *Journal of Veterinary Medicine And Physiological Pathology Clinical Medicine*, 2007, **54**(5), 276-9.

[33] HOMER MJ, AGUILAR DELFIN I, TELEFORD III SR, KRAUSE PJ, PERSING DH. Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 2000, **13**(3), 451-469.

[34] HUGNET C, BRUCHON-HUGNET C, BOURDOISEAU G. Amélioration du diagnostic de laboratoire de la babésiose canine : intérêt d'une technique d'enrichissement par centrifugation. *Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie*, 2000, **35**, 59-62.

[35] IKADAI H, TANAKA H, SHIBAHARA N, MATSUU A, UECHI M, ITOH N. *et al* Molecular evidence of infections with *Babesia gibsoni* parasites in Japan and evaluation of the diagnostic potential of a loop-mediated isothermal amplification method. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, **42**(6), 2465-2469.

[36] JEFFERIES R, RYAN UM, IRWIN PJ. PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. *Veterinary Parasitology*, 2007, **144**(1-2), 20- 27.

[37] JOLIVET G, MARCHAND A. Le piroplasme du chien aspects taxonomique, morphologique et biologique. *Animal de compagnie*, 1974, **2**, 125-131.

[38] KJEMTRUP AM, KOCAN AA, WHITWORTH L, MEINKOTH J, BIRKENHEUER AJ, CUMMINGS J *et al*. There are at least three genetically distinct small piroplasms from dogs. *International Journal for Parasitology*, 2000, **30**, 1501-1505.

[39] KJEMTRUP AM, WAINWRIGHT K, MILLER M, PENZHORN BL, CARRENO A. *Babesia conradae*, sp. Nov., a small canine *Babesia* identified in California. *Veterinary Parasitology*, 2006, **136**, 103-111.

[40] KOFFI Y. *Mise au point et validation d'un modèle d'infestation expérimentale du chien par Babesia canis*. Thèse Med. Vét., Lyon, 1999, n°78 100p.

- [41] KRIEGER N. *Intérêt des outils moléculaires dans le diagnostic des maladies tropicales transmises par les tiques*. Thèse Med. Vét., Lyon, 1999, n°34 158p.
- [42] LAMOUR T. *Contribution à l'étude de la réponse sérologique (immunofluorescence indirecte) du chien parasite par Babesia canis*. Thèse Med. Vét., Lyon, 1995, n°83 164p.
- [43] MATIJATKO V, MRLJAK V, KIS I, KUCER N, FORSEK J, ZIVICNJAK T *et al*. Evidence of acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology*, 2007, **144**(34), 242-250.
- [44] MATSUU A, MIYAMOTO K, IKADAI H, OKANO S, HIGUCHI S. Cloning of the *Babesia gibsoni* cytochrome B gene and isolation of three single nucleotide polymorphisms from parasites present after atovaquone treatment. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, 2006, **74**(4), 593–597.
- [45] MATSUU A, ONO S, IKADAI H, UCHIDE T, IMAMURA S, ONUMA M *et al*. Development of SYBR green real-time polymerase chain reaction assay for quantitative detection of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) DNA. *J. Vet. diagn. Invest*, 2005, **17**(6), 569-573.
- [46] Mc MANUS DP, BOWLES J. Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics. *International Journal for Parasitology*, 1996, **26**(7), 687-704.
- [47] MEYNARD J.A, GOUDICHARD JA. Piroplasmose canine. Caractères cliniques. *L'animal de compagnie*, 1974, **2**, 147-155.
- [48] MOREAU Y, LAURENT N, MARTINOD S, MACKOWIAK A, DUBREUIL N. Immunologie – Immunopathologie et essais d'immunoprévention de la piroplasmose canine. *Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie*, 1986, **21** (2), 85-95.

- [49] NEL M, LOBETTI RG, KELLER N, TOMPSON PN. Prognostic value of blood lactate, blood glucose, and hematocrit in canine babesiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2004, **18**, 471-476.
- [50] NORMAND T, CHABANE L. Geste technique de leucoconcentration chez le chien et le chat. *Le nouveau praticien*, 2005, 303, 35-36.
- [51] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, YONEKAWA T, WATANABE K, AMINO N, HASE T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 2000, **28**(12), 63.
- [52] ONISHI T, UEDA K, HORIE M, KAJIKAWA T, OHISHI L. Sérum hemolytic activity in dogs infected with *Babesia Gibsoni*. *Journal of Parasitology*, **76**, 564-567.
- [53] PAGES J. P., Kidney lesions in *Babesia canis var canis* infection. Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) Lyon 1999, Paris : *Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie* ,1999, 1-6.
- [54] PAGES JP, TROUILLET JL. Thrombocytopénie dans la babésiose du chien, *Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie*, 1984, **19**, 222-227.
- [55] PAGES J.P, TROUILLET JL. La babésiose du chien : mode d'action de *Babesia canis* et conséquences cliniques, *Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie*, 1986, **21** (2), 97-106.
- [56] PERCHEREAU D. Piroplasmose traitement étiologique. *Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie*. 1986, **21**, (2), 111-115.
- [57] POULIQUEN H. Principe actif - l'imidocarbe. *Le nouveau praticien vétérinaire*, août septembre 2005, **336**, 67-68.

- [58] ROBIN Y. Diagnostic de la piroplasmose canine par la recherche du piroplasme dans le sang technique et résultats de quatre années d'observations. *Animal de compagnie*, 1974, **2**, 133-143.
- [59] RUZINSKA MA, SPEILMAN A, LEWENGRUB S, TRAGER W, PIESMAN J. Sexuality in piroplasms as revealed by electron microscopy in *Babesia microti*. *Veterinary Parasitology*, 1983, **80**, 2966-2970.
- [60] SUZUKI K, WAKABAYASHI H, TAKAHASHI M, FUKUSHIMA K, YABUKI A, ENDO Y. A possible treatment strategy and clinical factors to estimate the treatment response in *Babesia gibsoni* infections. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2007, **69**(5), 563-568.
- [61] SOBCZYK AS, KOTOMSKI G, GORSKI P, WEDRYCHOWICZ H. Usefulness of touch-down PCR assay for the diagnostic of atypical cases of *Babesia canis canis* infections in dogs. *Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy Diseases*, 2005, **49**, 407-410.
- [62] UILENBERG G. *Babesia* – A historical overview. *Veterinary Parasitology*, 2006, **138**, 3-10.
- [63] VANDAELE E. La babésie africaine élargit la protection contre la piroplasmose. *Le Point Vétérinaire*, 2007, **38**([273](#));6-17.
- [64] VERCAMMEN F, DEKEN R, MAES L, Haematological and biochemical profile in experimental canine babesiosis after homologous and heterologous challenge. *Veterinary Parasitology*, 1997, **68**, 51-55.
- [65] VERDIDA RA, HARA OA, XUAN X, FUKUMOTO S, IGARASHI I, ZHANG S *et al*. Serodiagnosis of *Babesia gibsoni* infection in dogs by an improved Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with recombinant truncated P50. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2004, **66**(12) 1517-1521.

- [66] YAMANE I, THOMFORD JW, GARDNER IA, LEVY M, CONRAD PA. Evaluation of the indirect fluorescence antibody test for diagnosis of *Babesia gibsoni* infections in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 1993, **54**(10), 1579-1585.
- [67] YAMASAKI M, INOKUMA H, SUGIMOTO C, SHAW SE, AKTAS M, YABSLEY MJ, YAMATO O, MADE Y. Comparison and phylogenetic analysis of the heat shock protein 70 of *Babesia* parasites from dogs. *Veterinary Parasitology*, 2007, **145**(3-4), 217-227.
- [68] YOKOYAMA N, OKAMURA M, IGARASHI I. Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites : Current advances in elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. *Veterinary Parasitology*, 2006, **138**, 22-32.
- [69] ZHALER M, RINDER H, SCHEIN E, GOTHE R. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Veterinary Parasitology*, 2000, **89**, 241-248.

Annexes

Annexe 1: données issues des dossiers d'animaux
ayant eu une PCR positives par CAL

dossier	sexe	âge	localisation	type piroplasme	charge parasitaire
167263	F		60890	theileria	forte charge
164111	M		77440	theileria	forte charge
147059	M		77470	babesia canis canis	moyenne charge
143026	M	14	77640	theileria	moyenne charge
137325	F	8	?	non défini	forte charge
146512			38260	theileria	forte charge
139310	M	3	48210	babesia canis canis	
139031			38260	babesia canis canis	forte charge
137958	M	11	38260	babesia canis	forte charge
133503	M	4	38940	babesia canis canis	forte charge
127049	M		38260	babesia canis canis et babesia canis rossi	
146976	M	4	77200	babesia canis canis	moyenne charge
142111	M	1	77200	babesia canis canis	forte charge
167903	F	8	94700	babesia canis canis	forte charge
167814	M	10	10000	babesia canis canis	forte charge
163180	F		57245	babesia canis canis	faible charge
162958	M	6	91190	babesia canis canis	forte charge
162812	M	4	10000	babesia canis canis	forte charge
162139	M	8	51400	babesia canis canis	
156062	M	8	54500	babesia canis canis	moyenne charge
155342	M		41500	babesia canis canis	moyenne charge
155326			70180	babesia canis canis	moyenne charge
154658	M	2	54340	babesia canis canis	moyenne charge
155271	M	5	77890	babesia canis canis	moyenne charge
154549			92420	babesia canis canis	forte charge
152201	F		1560	babesia canis canis	
152200	M	5	21000	babesia canis canis	
151607	F			babesia canis canis	forte charge
151273	M		13400	babesia canis canis	
150004	F	3	57430	babesia canis canis	forte charge
149917	M	4	10000	babesia canis canis	
149575	F	3	1560	babesia canis canis	
149384	M	1	51150	babesia canis canis	forte charge
148693	M		21390	babesia canis canis	forte charge
148675	M	1	33710	babesia canis canis	moyenne charge
148216			94500	babesia canis canis	
148117	F		75016	babesia canis canis	
dossier	sexe	âge	localisation	type piroplasme	charge parasitaire

146634	F	4	91660	babesia canis canis	moyenne charge
145945	M	8	24210	theileria	moyenne charge
144180	M		95000	theileria	forte charge
144154	F	11	70240	babesia canis canis	forte charge
143813	F	10	78000	theileria	moyenne charge
142355	M	5	92500	babesia canis canis	forte charge
142251	F	11	41120	babesia canis canis	
139350		6	76410	babesia canis canis	
138956	F		10800	babesia canis canis	
138887	M		84270	babesia canis canis	
137958	M	11	38260	babesia canis canis	
137513	M	12	77260	babesia canis canis	faible charge
137319	M	5	71680	babesia canis canis	forte charge
136546	F	5	10000	theileria	
136550	M	13	10600	babesia canis canis	
136300	F	8	52220	babesia canis canis	
136226	M	8	77114	babesia canis canis	faible charge
135957	F	2	68190	babesia canis canis	
135927	M		93190	babesia canis canis	
134886	F		60500	babesia canis canis	
133814	M	2	57905	babesia canis canis	forte charge
133602	M		21600	babesia canis canis	faible charge
131990	F		93290	babesia canis canis	
126702	M		21600	babesia canis canis	
126304	M		10600	babesia canis canis	forte charge
125191	M	2	10000	babesia canis canis	
124167			25000	non défini	
123750	M	9	78120	non défini	
122446	M		76410	babesia canis canis	
121727	M		77111	babesia canis canis	
157690	M	5	16300	babesia canis canis	moyenne charge
168404	F	5	33610	theileria	faible charge
159171	M	10	33830	babesia canis canis	moyenne charge
157546	M	6	35550	babesia canis canis	faible charge
168275	F	1	69420	theileria	faible charge
168159	F	11	62310	babesia canis canis	
143230	M	6	78000	theileria	faible charge
135701	M	6	78000	babesia canis canis	faible charge
167745	F	3	95490	babesia canis canis	forte charge

Annexe 2 : Tableau récapitulatif des analyses sanguines du cas clinique numéro 1

	Normes	26-avr	12-mai	10-juin	2-août	4-sep
Urée	0,2-0,6 g/l	0,545		0,624		
Créatinine	< 12 mg/l			7,6		
ALAT	10-100 UI	10		12		
PAL	23-212 UI	111		125		
Glucose	0,6-1,1 g/l			0,96		
Hématocrite	37-45%	34	49	20,2	39,4	39,9
Hémoglobine	12-18 g/l	10,4	14,8	9,2	13,1	12,9
Globules rouges	5500000-8500000/ mm3	4 100 000	5 700 000	2 180 000		
TCMH	19,5-24,5 picogrammes	25	26	45,4		
CCMH	31-36%	31	30	42,1		
VGM	60-77 microcubes	83	86	93		
Réticulocytes			1,80%	10%	0,70%	0,90%
Leucocytes	6000-17000 /mm3	18,3	7	40	15,2	19,4
Neutrophiles	50-68%	85	76	78		
Monocytes	2-10%	4	5	5		
Basophiles		0	0	0		
Eosinophiles	2-8%	1	4	0		
Lymphocytes	17-28%	10	15	17		
Plaquettes	200000-500000/mm3	81000	265000	310000	354000	604000
PCR babesia				positive	négative	
test de Coombs		positif (1/128)		positif (1/256)		

Annexe 3 : Tableau récapitulatif des analyses sanguines du cas clinique numéro 2

	Normes	2-mai	26-mai	15-juin	22-juin	29-aoû	12-sep
Urée	0,2-0,6 g/l	0,45					
Créatinine	< 12 mg/l	10					
ALAT	10-100 UI	25					
PAL	23-212 UI	60					
Glucose	0,6-1,1 g/l	1,05					
Hématocrite	37-45%	28,1	30,6	33,4		37,1	38
Hémoglobine	12-18 g/l	9	9,7	12		12,4	13,8
Globules rouges	5500000-8500000/mm ³	3 710 000	3 850 000	4 580 000		5 280 000	5 410 000
TCMH	19,5-24,5 picogrammes	26,7	25,3	26,2		23,5	25,6
CCMH	31-36%	31,9	31,8	36		33,5	36,4
VGM	60-77 microcubes	76	79	73		70	70
Réticulocytes		0,10%	2,5				
Leucocytes	6000-17000/mm ³	5590	8680	9100		7800	9000
Neutrophiles	50-68%	56	61				
Monocytes	2-10%	34	32				
Basophiles		0	0				
Eosinophiles	2-8%	0	4				
Lymphocytes	17-28%	10	3				
Plaquettes	200000-500000/mm ³	26 000	43 000	138 000		187 000	
Frottis		quelques piroplasmes	pas de piroplasma				
charge parasitaire			positive forte charge	positive forte charge	positive forte charge		

XIV. Annexe 4 : Numération formule et PCR du cas clinique numéro 3



Companion Animal Laboratory
analyses vétérinaires pour animaux de compagnie et de sport..
Tél: 03 25 73 81 20
Fax: 73 25 73 80 40
1, Rue Salomon Rachi BP 613
10088 TROYES CEDEX

CHIEN TIMON Né(e) le 23/10/2002
Dossier n°: 157690 du 27/07/2007
Ordonnance du 25/07/2007

Valeurs de référence		Antérieur	Valeurs de référence		Antérieur
HEMATOLOGIE-CYTOLOGIE					
HEMOGRAMME					
<i>Numérations globulaires</i>					
Hématies	* 4 310 000 /mm ³	5500000 - 8500000			
Hémoglobuline	* 11.6g/ dl	12.0 - 18.0			
Hématocrite	* 34.0%	37.0 - 45.0			
Volume Globulaire Moyen	* 79μl (fl	80 - 77			
TCMH	* 27.0pg	19.5 - 24.5			
CCMH	* 34.2%	35.0 - 36.0			
Leucocytes	6 930 /mm ³	6000 - 17000			
<i>Formule sanguine</i>					
Polynucléaires neutrophiles	* 78%	50 - 68			
Polynucléaires éosinophiles	* 1%	2 - 8			
Polynucléaires basophiles	0 %				
Lymphocytes	18 %	17 - 28			
Monocytes	3 %	3 - 8			
soit : Poly. neutrophiles . . . 5 405 /mm ³ 3000 - 11500					
Poly. éosinophiles * 69/mm ³ 100 - 1250					
Poly. basophiles 0 /mm ³					
Lymphocytes 1 247 /mm ³ 1000 - 4800					
Monocytes 208 /mm ³ 150 - 1350					
Anisocytose globulaire (++)					
Anisochromie (+++)					
Hémaparassites : Absence de piroplasmes					
L'absence de Babesia n'élime pas l'hypothèse, en fonction de la clinique: recherche par PCR sur sang EDTA.					
Le 03/01/2008 Toutes les valeurs de référence sont données en fonction de l'espèce. Cette feuille est strictement réservée au praticien. D.E.C.V.C.P. <i>Confraternellement,</i>					

Numération plaquettaire
(vérification sur cellule de Malassez)

Plaquettes * 51 000 /mm³ 200000 - 500000

Morphologie (sur frottis) Anisocytose plaquettaire et quelques amas

Réticulocytes 9.0 %

soit : 387 900 /mm³

Anémie macrocytaire normochrome régénérative

Thrombopénie artéfactuelle .

Conclusion :
Résultats compatibles avec une perte , une fuite , une consommation , de globules rouges

ANALYSE MOLÉCULAIRE

IDENTIFICATION DE RICKETTSIA / NEORICKETTSIA

Polymerase chain reaction

PCR temps réel (Q-PCR)

Origine : sang

Recherche de l' ADN bactérien : Négative < 1 copie

seuil de sensibilité: 1 copie

Conclusion :
Absence de bactérie dans le prélèvement.
pour en savoir plus:
1*) Lindsay Boozer, DVM, Douglas Macintre. Babesia gibsoni: an emerging pathogen in dogs, Cmp on cont educ. vol 27, n°1, january 2005.
2*) Adam J. Birkenheuer, DVM, PhD, DACVIM, and coll: Geographic distribution of babesiosis among dogs in the united states and association with dog bites: 150 cases (2000-2003), JAVMA, vol 227, N°6, setempber 15, 2005/

RECHERCHE DE LEPTOSPIRA INTERROGANS

Quantitative polymerase chain

Pcr en temps réel

Origine : sang + urines

Dossier n°: 157690 du 27/07/2007

Valeurs de référence Antérieur

Valeurs de référence Antérieur

Recherche de l'ADN bactérien Négative < 10 copies

Origine : sang

Recherche de l'ADN parasitaire : Positive charge moyenne

Conclusion :

Absence de leptospires pathogènes dans le prélèvement

seuil de détection: 10 copies

IDENTIFICATION D'EHRLICHIA/ ANAPLASMA

Polymerase chain reaction

PCR temps réel (Q-PCR)

Origine : sang

Recherche de l'ADN d'ehrlichia spp Négative < 1 copie

seuil de sensibilité: 1 copie

Recherche de l'ADN d'anaplasma Négative < 1 copie

seuil de sensibilité: 1 copie

Conclusion :

Absence de bactérie dans le prélèvement.

pour en savoir plus:

1*) Lindsay Boozer, DVM, Douglas Macintre. Babesia gibsoni: an emerging pathogen in dogs,

Cmpm on cont educ. vol 27, n°1, january 2005.

2*) Adam J. Birkenheuer, DVM, PhD, DACVIM, and coll: Geographic distribution of babesiosis among dogs in the united states and association with dog bites: 150 cases (2000-2003), JAVMA, vol 227, N°6, setempber 15, 2005/

ce test détecte 21 espèces d'ehrlichia dont

Canis, Ruminatum, Ewingii, Ovis, Muris,

et 8 espèces d'anaplasma dont

Phagocytophilum, Platys, Ovis, Bovis,

Centrale, Marginale.

IDENTIFICATION DE BARTONELLA

Polymerase chain reaction

temps réel (Q-PCR)

Origine : sang

Recherche de l'ADN bactérien : Positive 100 copies

Conclusion :

Présence de bactéries dans le prélèvement. Compatible avec une bartonellose.

Pour en savoir plus:

*) Infections à Bartonella chez les carnivores, HJ boulouis, M. Vayssier-taussat, G. Marignac, N. Haddad, encyclopedie vétérinaire, 53 eme numero, avril-mai-juin - Trimestriel 2007.

*) Les infections à Bartonella chez l'homme et l'animal: aspect diagnostiques et thérapeutiques. HJ Boulouis, M. Vayssier-taussat, G. Marignac, N. Haddad, maillard. Revue francophone des Laboratoires, n°391, avril 2007.

IDENTIFICATION DE BABESIA SP.

Technique polymerase chain

Conclusion :

Présence de parasites dans le prélèvement.

pour en savoir plus:

Lindsay Boozer, DVM, Douglas Macintre. Babesia gibsoni: an emerging pathogen in dogs,

Comp on cont educ. vol 27, n°1, january 2005.

2*) Adam J. Birkenheuer, DVM, PhD, DACVIM, and coll: Geographic distribution of babesiosis among dogs in the united states and association with dog bites: 150 cases (2000-2003), JAVMA, vol 227, N°6, setempber 15, 2005.

traitement pour le chien :

Carbésia à dose préventive, deux fois à trois semaines d'intervalle.

A défaut, le Professeur Guillot (ENVA) propose d'associer:

Clindamicyne 12 mg/kg/matin et soir au chlorhydrate de quinine(cf Vidal) 8 mg/kg/prise per os, 3prises par jour, pendant 12 jours.

Cette feuille est strictement réservée au praticien.

Annexe 5 : Numération formule du cas clinique numéro 4

	Normes	2-mai
Urée	<i>0,2-0,6 g/l</i>	0,6
Créatinine	<i>< 12 mg/l</i>	22,3
ALAT	<i>10-100 UI</i>	4
PAL	<i>23-212 UI</i>	147
Glucose	<i>0,6-1,1 g/l</i>	1,1
Protéines totales	<i>54-82 g/l</i>	64
Hématocrite	<i>37-45%</i>	34
Hémoglobine	<i>12-18 g/l</i>	14
Globules rouges	<i>5500000-8500000/ mm³</i>	7 070 000
TCMH	<i>19,5-24,5 picogrammes</i>	19,8
CCMH	<i>31-36%</i>	30,5
VGM	<i>60-77 microcubes</i>	83
Leucocytes	<i>6000-17000 /mm³</i>	5 810
Neutrophiles	<i>50-68%</i>	75,2
Monocytes	<i>2-10%</i>	3,3
Basophiles		0
Eosinophiles	<i>2-8%</i>	0
Lymphocytes	<i>17-28%</i>	20,8
Plaquettes	<i>200000-500000/mm³</i>	175 000
Frottis		négatif
charge parasitaire		forte charge

Annexe 6 : PCR du cas clinique numéro 5



C A L

ompanion animal laboratory
analyses vétérinaires pour animaux de compagnie et de sport.

Tél: 03 25 73 81 20
Fax: 73 25 73 80 40
1, Rue Salomon Rachi BP 613
10088 TROYES CEDEX

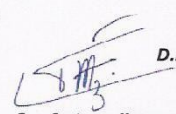
Le 03/01/2008 Docteur Vétérinaire
Clinique Vétérinaire

CHIEN SIMBA Né(e) le / / 2001
Dossier n°: 157546 du 26/07/2007
Ordonnance du 26/07/2007

Valeurs de référence	Antérieur
Aspect du prélèvement ... volume 100 ul résultat sous réserve ANALYSE MOLÉCULAIRE. RECHERCHE DE LEPTOSPIRA INTERROGANS Quantitative polymerase chain Pcr en temps réel Origine : sang edta Recherche de l' ADN bactérien : Négative < 10 copies Conclusion : Absence de leptospires pathogènes dans le prélèvement seuil de détection: 10 copies IDENTIFICATION D'EHRlichia/ ANAPLASMA PCR temps réel (Q-PCR) Polymerase chain reaction Origine : sang edta Recherche de l' ADN d'ehrlichia spp : Négative positive 10 copies seuil de sensibilité: 1 copie Recherche de l' ADN d'anaplasma : Négative < 1 copie seuil de sensibilité: 1 copie ce test détecte 21 espèces d'ehrlichia dont Canis, Ruminatum, Ewingii, Cynis, Muris, et 8 espèces d'anaplasma dont Phagocytophilum, Platys, Ovis, Bovis, Centrale, Marginale IDENTIFICATION DE LEISHMANIA INFUNDUM. Technique polymerase chain Origine : sang edta Négative Conclusion : Absence de parasites dans le prélèvement, à interpréter en fonction de la clinique, de la sérologie, etc. Cette technique sophistiquée permet la mise en évidence de l'ADN du parasite et non plus simplement de la trace sérique du passage de celui-ci. Le diagnostic reste pour l'essentiel lié à la réalisation d'une sérologie et d'une électrophorèse sérique.	
Pour la leishmaniose ce test est intéressant pour le diagnostic d'expression clinique équivoque, mais surtout pour vérifier la guérison biologique et non le "blanchiment" du malade après traitement. Pour statuer sur la guérison d'un malade traité, il convient de vérifier sa négativité au moins deux fois de suite à quelques d'intervalle. IDENTIFICATION DE BABESIA SP. Technique polymerase chain Origine : sang edta Recherche de l' ADN parasitaire : Positive charge faible Conclusion : Présence de parasites dans le prélèvement. pour en savoir plus: Lindsay Boozor, DVM, Douglas Macintyre. Babesia gibsoni: an emerging pathogen in dogs. Comp on cont educ. vol 27, n°1, January 2005. 2*) Adam J. Birkenheuer, DVM, PhD, DACVIM, and coll: Geographic distribution of babesiosis among dogs in the united states and association with dog bites: 150 cases (2000-2003), JAVMA, vol 227, N°6, septembre 15, 2005. traitement pour le chien : Carbésia à dose préventive, deux fois à trois semaines d'intervalle. A défaut, le Professeur Guillot (ENVA) propose d'associer: Clindamycine 12 mg/kg/matin et soir au chlorhydrate de quinine(cf Vidal) 8 mg/kg/prise per os, 3prises par jour, pendant 12 jours.	
INFORMATION (S) Pendant la période des congés, le Cal est ouvert sans interruption et assure les mêmes prestations.	

Le 03/01/2008 Toutes les valeurs de référence sont données en fonction de l'espèce.

Cette feuille est strictement réservée au praticien.


D.E.C.V.C.P.
Confraternellement,