ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année 2007 - Thèse n° 48

INCIDENCE DES MALADIES BACTERIENNES A TRANSMISSION VECTORIELLE LORS D'ANEMIE IMMUNOLOGIQUE CHEZ LE CHIEN

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
Et soutenue publiquement le 4 septembre 2007
Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Emilie VIDEMONT
Née le 24 décembre 1983
à Laxou (54)

DEPARTEMENT ET CORPS ENSEIGNANT DE L'ENVL

Directeur : Stéphane MARTINOT

Mise à jour : 20/07/2007

	PR EX	PR 1	PR 2	MC	Contractuel, Associé, IPAC et ISPV	AERC	Chargés de consultations et d'enseignement
DEPARTEMENT SANTE PUBLIQUE VETERINAIRE							
Microbiologie, Immunologie, Pathologie Générale	Y. RICHARD		A. KODJO	V. GUERIN-FAUBLEE D. GREZEL			
Pathologie infectieuse			A. LACHERETZ M. ARTOIS	J. VIALARD			
Parasitologie et Maladies Parasitaires	MC. CHAUVE	G. BOURDOISEAU		MP. CALLAIT CARDINAL L. ZENNER			
Qualité et Sécurité des Aliments			P. DEMONT C. VERNOZY	A. GONTHIER S. COLARDELLE			
Législation et Jurisprudence			A. LACHERETZ				
Bio-informatique - Bio-statistique				P. SABATIER ML. DELIGNETTE K. CHALVET-MONFRAY			
DEPARTEMENT ANIMAUX DE COMPAGNIE							
Anatomie			T. ROGER	S. SAWAYA	C. BOULOCHER		
Chirurgie et Anesthésiologie		JP. GENEVOIS	D. FAU E.VIGUIER D. REMY	C.CAROZZO	S. JUNOT (MCC) K. PORTIER (MCC)		
Anatomie-pathologique/Dermatologie-Cancérologie			C. FLEURY	T. MARCHAL	P. BELLI D. PIN		
Hématologie		C. FOURNEL			D. WATRELOT-VIRIEUX (MCC)		
Médecine interne		JL. CADORE	L. CHABANNE	F. PONCE M. HUGONNARD C.ESCRIOU	I. BUBLOT		
Imagerie Médicale					J. SONET (MCC)		
DEPARTEMENT PRODUCTIONS ANIMALES							
Zootechnie, Ethologie et Economie Rurale		M. FRANCK		L. MOUNIER			
Nutrition et Alimentation				D. GRANCHER L. ALVES DE OLIVEIRA G. EGRON			
Biologie et Pathologie de Reproduction		F. BADINAND	M. RACHAIL-BRETIN P. GUERIN	S. BUFF	A. C. LEFRANC		
Pathologie Animaux de Production	P. BEZILLE		T. ALOGNINOUWA	R. FRIKHA M.A. ARCANGIOLI D. LE GRAND			G. LESOBRE P. DEBARNOT D. LAURENT
DEPARTEMENT SCIENCES BIOLOGIQUES							
Physiologie/Thérapeutique				J.J. THIEBAULT J.M. BONNET-GARIN			
Biophysique/Biochimie		E. BENOIT F. GARNIER		T. BURONFOSSE			
Génétique et Biologie moléculaire			F. GRAIN	V. LAMBERT			
Pharmacie/Toxicologie Législation du Médicament		G. KECK	P. JAUSSAUD P. BERNY				
Langues					C. FARMER T. AVISON		
DEPARTEMENT HIPPIQUE							
Pathologie équine		JL. CADORE		A. BENAMOU-SMITH			
Clinique équine		O. LEPAGE		A. LEBLOND	M. GANGL		

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur ETIENNE,
De la faculté de Médecine de Lyon,
Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.
Avec toute ma gratitude et mes hommages respectueux.

A Monsieur le Professeur CHABANNE,
De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,
Qui m'a inspiré le sujet de cette thèse et a permis l'achèvement de ce travail.
En témoignage de ma reconnaissance pour son aide, sa disponibilité et sa gentillesse.
Mes très sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur BOURDOISEAU,
De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,
Qui m'a fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.
Sincères remerciements.

Au Docteur Mélanie PASTOR,
De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,
Qui m'a beaucoup aidé et guidé dans la réalisation de ce travail.
Sincères remerciements.

TABLE DES MATIERES

Index des abréviations ***7***

Introduction ***8***

Première partie : Origine et diagnostic des anémies immunologiques chez le chien ***9***

Chapitre I : Origine et pathogénie des anémies immunologiques .. ***10***

I. Définitions **10**
- **A. Anémie** 10
- **B. Anémies immunologiques** 12

II. Classification et origine des anémies immunologiques **13**
- **A. Selon l'origine et la pathogénie** 13
  - **1. Terminologie utilisée** 13
  - **2. Origine des anémies auto-immunes** 18
    - ***2.1. Définition et origine des maladies auto-immunes*** 18
    - ***2.2. Identification de l'auto-antigène lors d'AHAI*** 21
  - **3. Origine des anémies immunologiques secondaires** 23
    - ***3.1. Agents infectieux*** 23
      - *a. Principaux agents impliqués* 23
      - *b. Mécanismes* 24
    - ***3.2. Médicaments et toxiques*** 25
      - *a. AHMI secondaires à un traitement médicamenteux* 25
      - *b. AHMI secondaires à une vaccination* 26
      - *c. AHMI secondaires à une envenimation* 28
      - *d. AHMI secondaires à une intoxication* 28
    - ***3.3. Pathologie tumorale*** 29
- **B. Selon la nature du revêtement anticorps et ses conséquences** 29
  - **1. Selon le site de destruction** 30
    - ***1.1. Agglutination intra-vasculaire*** 32
    - ***1.2. Hémolyse intra-vasculaire*** 32
    - ***1.3. Hémolyse extravasculaire*** 33
  - **2. Selon le comportement thermique des anticorps** 35
    - ***2.1. Les classes à anticorps dits « chauds »*** 35
      - *a. La classe I* 35
      - *b. La classe II* 36
      - *c. La classe III* 36
    - ***2.2. Les classes à anticorps dits « froids »*** 36
  - **3. Selon l'isotype de l'anticorps** 37
    - ***3.1. IgG*** 37
    - ***3.2. IgM*** 37
    - ***3.3. Autres isotypes*** 37
  - **4. Bilan** 37

III. Anémie et agents pathogènes hémotropes chez le chien **38**
- **A. Les agents pathogènes hémotropes du chien** 38
  - **1. Définition, notion d'hémopathogène et classification** 38
    - ***1.1. Définition et présentation générale*** 38
    - ***1.2. Les rickettsies*** 39
      - *a. Famille des Rickettsiaceae* 39
      - *b. Famille des Anaplasmataceae* 40
    - ***1.3. Les bartonelles*** 42
    - ***1.4. Les hémoplasmes*** 42

1.5. Les piroplasmes 42
2. **Expression clinique** 43
2.1. Ehrlichiose monocytaire canine à Ehrlichia canis 43
2.2. Autres « ehrlichioses » canines 44
a. Ehrlichiose monocytaire canine à Ehrlichia chaffeensis 44
b. Ehrlichiose granulocytaire canine à Anaplasma phagocytophilum 44
c. Thrombopénie cyclique à Anaplasma platys 44
2.3. *Fièvre pourprée des montagnes rocheuses* (*Rickettsia rickettsii*) 45
2.4. *Infections à Bartonella spp.* 45
2.5. Infection à Mycoplasma haemocanis 45
2.6. Piroplasmose 45
2.7. Cas des co-infections 46
B. **Pathogénie de l'anémie** 47
1. **Rickettsioses** 47
2. **Infection à *Bartonella spp.*** 49
3. **Piroplasmose** 49

Chapitre II : Etude clinique ***50***

I. Critères épidémiologiques **50**
A. **Age** 50
B. **Sexe et statut sexuel** 51
C. **Races prédisposées** 51
D. **Autres facteurs** 53
1. **Influence saisonnière** 53
2. **Groupe sanguin** 53
E. **Bilan des différentes études** 54

II. Critères cliniques **56**
A. **Forme classique : hémolyse due aux anticorps chauds** 56
1. **Symptômes liés à l'anémie** 56
1.1. Baisse de l'état général 56
1.2. Pâleur des muqueuses 56
1.3. Modifications cardiovasculaires et respiratoires 57
2. **Symptômes liés à l'hyperhémolyse** 57
2.1. Hyperthermie 57
2.2. Pigmenturie 57
2.3. Ictère 57
2.4. Splénomégalie et hépatomégalie 58
3. **Autres signes** 58
3.1. Signes digestifs 58
3.2. Lymphadénopathie 58
3.3. Divers 58
4. **Synthèse** 59
B. **Formes particulières dues aux anticorps froids** 59
1. **Maladie des agglutinines froides** 59
2. **Hémolyse *a frigore*** 59
C. **Complications** 59
1. **Choc circulatoire** 60
2. **Troubles de la coagulation, thrombopénie, CIVD et thromboembolie** 60
2.1. Thrombopénie 60
2.2. CIVD et état d'hypercoagulabilité 60
2.3. Thromboembolie 62

III. Critères biologiques **63**
A. **Paramètres hématologiques** 63
1. **Anémie** 63
1.1. Intensité de l'anémie 63
1.2. Caractérisation de l'anémie 63
2. **Frottis sanguin** 64
2.1. Polychromatophilie, anisocytose et anisochromie 65

2.2. Sphérocytose 65
2.3. Hémoparasites 66
2.4. Fantômes de GR 67
2.5. Images d'érythrophagocytose 67
2.6. Divers 67
3. **Réticulocytes** 67
3.1. Définition et caractéristiques 67
3.2. Production réticulocytaire 68
3.3. Valeurs 68
3.4. Réticulocytose lors d'AHMI 69
a. Données bibliographiques 69
b. Absence de réticulocytose 69
4. **Modifications de la lignée blanche** 70
4.1. Données de l'hémogramme 70
4.2. Origine des modifications 71
a. Leucocytose 71
b. Leucopénie 72
5. **Plaquettes** 72
5.1. Données de l'hémogramme 72
5.2. Origine de la thrombopénie 72
6. **Bilan des données de l'hémogramme** 73
B. **Paramètres biochimiques** 73
1. **Rappel sur la dégradation des globules rouges, hémolyse intra et extravasculaire** 73
1.1. Hémolyse extravasculaire 73
1.2. Hémolyse intra vasculaire 74
2. **Paramètres rénaux** 77
3. **Paramètres hépatiques** 77
4. **Produits de dégradation de l'hémoglobine** 77
4.1. Bilirubinémie 77
4.2. Modifications lors d'hémolyse intra vasculaire 78
5. **Autres paramètres biochimiques** 78
6. **Analyse d'urines** 79
6.1. Hémoglobinurie 79
6.2. Hémosidérinurie 79
6.3. Bilirubinurie 79
6.4. Urobilinurie 79

IV. Lésions 79

V. Pronostic 80
A. **Paramètres épidémiologiques** 80
B. **Paramètres hématologiques** 80
C. **Paramètres biochimiques** 81
D. **Paramètres cliniques** 81
E. **Affections concomitantes** 81

Chapitre III : Diagnostic *81*

I. Démarche générale 81
A. **Première étape** 82
B. **Deuxième étape** 82
C. **Troisième étape** 82

II. Détermination du caractère immunologique de l'anémie 82
A. **Auto-agglutination sur lame ou en tube** 83
B. **Sphérocytose** 84
C. **Fragilité osmotique** 84
D. **Mise en évidence d'un revêtement anticorps sur les hématies** 84
1. **Test de Coombs direct** 84
1.1. Définition, principe 85
1.2. Nature de l'antisérum 86

1.3. Technique 86
a. Prélèvement sanguin 86
b. Réalisation du test 87
1.4. Interprétation 87
1.5. Résultats du TCD 88
1.6. Sensibilité, spécificité 88
a. Manque de spécificité, faux positifs 89
b. Manque de sensibilité, faux négatifs 91
1.7. Amélioration de la spécificité 92
a. TCD à l'antiglobuline monospécifique 92
b. Test de Coombs Indirect (TCI) 92
c. Epreuve d'élution-fixation 93
1.8. Amélioration de la sensibilité du TCD 94
a. TCD à froid 94
b. Utilisation de solutions salines à faible concentration 94
c. Prétraitement enzymatique 95
d. Utilisation de substances macromoléculaires (test au Polybrène)* 97
e. Gel test 97
f. Cytométrie de flux 98
g. Test direct à l'antiglobuline liée à une enzyme 98
h. Test à l'antiglobuline radio-immunologique 100
1.9. Autres procédures immunodiagnostiques dans le cadre des AHAI canines 100

E. Myélogramme 100

Deuxième partie : Etude de 40 cas d'anémies immunologiques chez le chien 102

Introduction et buts de l'étude 103

Chapitre I : Matériel et méthode 103

I. Sélection des cas et échantillons 103
A. Provenance des animaux 103
B. Recueil et organisation des données 103
1. Données épidémiologiques 104
2. Données cliniques 104
3. Groupe « témoin » 104
C. Critères de sélection 104
D. Prélèvements biologiques 106

II. Hémogramme 106
A. Hémogramme de base 106
1. Paramètres mesurés par l'automate 106
2. Valeurs de référence du laboratoire et interprétation 106
2.1. Lignée érythrocytaire 106
2.2. Lignée leucocytaire 107
2.3. Lignée plaquettaire 107
B. Réticulocytes 107
C. Examen du frottis sanguin 107

III. Analyses en immuno-hématologie 108
A. Tests de Coombs 108
1. TCD à chaud 108
1.1. Réalisation 108
1.2. Technique 108
2. TCD à froid 109
2.1. Réalisation 109
2.2. Technique 109
3. TCI 109
3.1. Réalisation 109

3.2. Technique 110
B. Dosage des anticorps anti-nucléaires 110
C. Myélogramme 110

IV. Mise en évidence des agents bactériens 110
A. Lecture du frottis sanguin 110
B. Technique de biologie moléculaire 111
1. Rappels 111
2. Etapes 111
2.1. Extraction de l'ADN 111
2.2. Amplification moléculaire 111
2.3. Identification 112
C. Sérologies 112
1. Rappels 112
2. Techniques 113
2.1. Recherche d'anticorps anti- E. canis 113
a. Principe 113
b. Manipulations 113
c. Lecture 113
2.2. Recherche d'anticorps anti-A. phagocytophilum 113
a. Technique 114
b. Lecture 114

V. Autres examens complémentaires 114
A. Recherche d'autres maladies infectieuses 114
B. Dosages biochimiques 114

Chapitre II : Résulats et discussion *115*

I. Caractéristiques épidémiologiques 115
A. Influence de la race 115
B. Influence de l'âge 116
C. Influence du sexe 117

II. Etude clinique 117
A. Motifs de consultation 117
B. Examen clinique des animaux 118
C. Recherche de phénomènes d'hyperhémolyse 119

III. Etude hématologique 121
A. La lignée érythrocytaire 121
B. La lignée plaquettaire 123
C. La lignée leucocytaire 123
D. Lecture du frottis sanguin 124

IV. Myélogramme 125
A. Lignée érythroïde 125
B. Populations cellulaires accessoires en proportion anormalement élevée 126
C. Anomalies de la lignée mégacaryocytaire 126
D. Anomalies de la lignée myéloïde 127

V. Analyses en immuno-hématologie 127
A. Tests de Coombs 127
1. TCD à chaud 127
2. TCD à froid 128
3. TCI 129
4. Discussion des résultats 129
B. Dosage des anticorps anti-nucléaires 130

VI. Mise en évidence des agents bactériens 130
A. Résultats 130
1. Par mise en évidence directe 130

2. Par immunofluorescence indirecte 130
2.1. Recherche des anticorps anti-E. canis 130
2.2. Recherche des anticorps anti- A. phagocytophilum 131
3. Par technique PCR 131
4. Bilan 131
B. Etude des cas présentant un résultat positif 131
C. Limites des différentes méthodes utilisées 132
D. Discussion des résultats négatifs 133
1. Rôle des traitements antérieurs 133
2. Diversité des espèces rickettsiennes 134
3. Problèmes techniques 134
4. Absence d'implication des agents recherchés 135

VII. Résultats des autres examens complémentaires 135
A. Recherche d'autres maladies infectieuses 135
B. Dosages biochimiques 136
C. Résultats des autres examens complémentaires 137

Conclusion 139

Bibliographie 140

Index des figures 152

Index des encadrés 152

Index des tableaux 152

Index des annexes 153

Annexes 154

Index des abréviations

Ac : anticorps
AcAN : anticorps anti-nucléaire
ADN : acide déxoxyribonucléique
Ag : antigène
AHAI : anémie hémolytique auto-immune
AHMI : anémie hémolytique à médiation immune
AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien
ALAT : alanine aminotransférase
ANRMI : anémie non régénérative à médiation immune

BC : bilirubine conjuguée
BNC : bilirubine non conjuguée
BSA : bovine serum albumin

C : complément
CAM : complexe d'attaque membranaire
CCMH : concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
CIVD : coagulation intra-vasculaire disséminée
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

DELAT : direct enzyme-linked antiglobulin test

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
ENVL : Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon
ENVA : Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

F : femelle
Fab : fragment liant l'antigène
Fc : fragment constant

GGT : gamma glutamyl transpeptidase
GR : globule rouge

Hb : hémoglobine
Ht : hématocrite

IFI : immunoflurorescence indirecte
Ig : immunoglobuline
IPR : index de production érythrocytaire

LB : lymphocyte B
LES : lupus érythémateux systémique
LISS : low ionic salin solution
LT : lymphocyte T

M : mâle
MAI : maladie auto-immune
MDA : malondialdéhyde
MI : médiation immune

NL : noeud lymphatique
NO : acide nitrique
NR : non réalisé

PAL : phosphatase alcaline
PBS : phosphate buffered saline (solution saline tamponnée)
PCR : polymerase chain reaction
PRCA : pure red cell aplasia

SPA : protéine A staphyloccocique
SRE : système réticulo-endothélial

TCD : test de Coombs direct
TCMH : teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine
TCI : test de Coombs indirect
TMI : thrombopénie à médiation immune
TNF : tumor necrosis factor

UV : ultra-violet

VGM : volume glomérulaire moyen
VU : valeurs usuelles

INTRODUCTION

Les anémies immunologiques sont des anémies résultant d'une destruction immunologique des globules rouges ou plus rarement des précurseurs érythroïdes médullaires. Depuis une vingtaine d'années, ces affections, essentiellement étudiées et décrites dans l'espèce humaine, sont également documentées dans l'espèce canine et leur incidence dans cette espèce semble en augmentation constante.
Ces anémies immunologiques sont le plus souvent qualifiées de primaires ou « idiopathiques » dans la mesure où aucune cause sous-jacente ou maladie n'est associée. Elles peuvent, cependant, se développer parallèlement à un autre processus pathologique. Les affections pouvant s'accompagner d'une anémie immunologique sont nombreuses, certaines sont bien connues chez l'homme comme chez l'animal alors que d'autres sont régulièrement citées dans la littérature sans que de véritables preuves de leur implication ne soit effectivement bien étayée. Parmi les affections sous-jacentes dont le rôle n'est pas clairement déterminé lors de la survenue d'anémies immunologiques, on trouve le groupe des maladies infectieuses liées à des agents bactériens du groupe des Rickettsies au sens large (ehrlichioses et rickettsioses *sensu stricto*) et les bartonelloses.

Le but du travail exposé ici est, dans un premier temps, de réaliser une synthèse bibliographique chez le chien sur l'origine et le diagnostic des anémies immunologiques. Des rappels concernant l'origine et la pathogénie de ces anémies, leur présentation clinique et enfin leur diagnostic sont réalisés. Une partie est également spécifiquement consacrée à la relation entre ce type d'anémie et les principaux agents pathogènes hémotropes chez le chien.

Dans un second temps, une étude expérimentale portant sur 40 cas d'anémies immunologiques diagnostiqués à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, au cours des années 2005 à 2007, est présentée. Elle a pour objectif d'évaluer l'incidence de certaines maladies bactériennes à transmission vectorielle, en particulier les ehrlichioses et les rickettsioses, lors d'anémie immunologique chez le chien.

PREMIERE PARTIE

ORIGINE ET DIAGNOSTIC DES ANEMIES IMMUNOLOGIQUES CHEZ LE CHIEN

Chapitre I : Origine et pathogénie des anémies immunologiques

I. Définitions

A. Anémie

Une **anémie** se définit comme une diminution de la quantité d'hémoglobine fonctionnelle circulante totale (« diminution de la quantité d'hémoglobine contenue dans l'unité de volume de sang, le volume plasmatique n'étant pas augmenté » selon Jean Bernard). En pratique, l'anémie est définie comme l'abaissement de la concentration en hémoglobine du sang périphérique au-dessous de **12 g/dL** (ou 100 mL) chez le chien (*Fournel 1994, Gaillot 1998, Stewart 1993a*).

La baisse de la concentration en hémoglobine peut résulter de deux mécanismes fondamentaux, une **majoration des pertes** à laquelle une augmentation compensatrice de la production médullaire ne parvient pas à faire face ou une **diminution de la production médullaire.**

Les anémies dues à un **excès de pertes** sont liées à une disparition accélérée des hématies circulantes et résultent soit d'une **hémorragie**, soit d'une **hyperhémolyse**. Dans ce cas, la moelle osseuse tend à compenser l'excès de perte et les réticulocytes augmentent, témoignant de cet effort même si cette augmentation est légèrement retardée (délai de 3 à 5 jours) par rapport au début de l'anémie (*Weiss 1984*). On qualifie souvent les anémies de ce premier groupe d'**anémies régénératives**. On parle également d'**anémies périphériques** par opposition aux anémies dites centrales liées à un défaut de production médullaire, qui sont également qualifiées d'anémies arégénératives. Si la perte est modérée, elle peut être compensée par l'hyperactivité de la moelle osseuse et, après quelques jours, la concentration en hémoglobine peut revenir à la normale, seule l'hyper réticulocytose est détectée sur l'hémogramme pour témoigner de ce phénomène (hémorragies ou hémolyses « compensées »).

Les **hyperhémolyses** (*Tableau 1*) reconnaissent une origine corpusculaire (ou constitutionnelle, presque toujours d'origine congénitale, liée à une anomalie de la membrane érythrocytaire, à une anomalie du contenu enzymatique de l'hématie ou à une anomalie hémoglobinique) ou une origine extra corpusculaire acquise liée à un agent infectieux, à une agression immunologique, à un facteur toxique ou à un facteur mécanique.

Lors de la **diminution de la production médullaire**, la baisse du taux de réticulocytes est le *primum movens* de l'anémie et elle précède la baisse de la concentration en hémoglobine. Le défaut de production des réticulocytes par la moelle peut être du à deux grands types de mécanismes : l'absence ou la diminution du nombre d'érythroblastes (insuffisance quantitative pure) ou une anomalie qualitative de la lignée érythroblastique entraînant la mort dans la moelle d'une partie des érythroblastes (qualifiée également d'érythropoïèse inefficace ou dysérythropoïèse).

La diminution, voire la disparition des érythroblastes peut avoir théoriquement trois causes : la raréfaction des cellules souches, une diminution de la différenciation des

progéniteurs en érythroblastes (par exemple par défaut d'érythropoïétine) ou une destruction des érythroblastes. La disparition du tissu médullaire normal peut aussi être due à l'envahissement de la moelle par un tissu étranger ou anormal (cellules cancéreuses, fibrose).

Au cours des insuffisances qualitatives, la lignée érythroblastique est anatomiquement présente, voire souvent hyperplasique, mais l'érythropoïèse est inefficace et les érythroblastes « avortent » avant d'arriver à maturité ou au stade réticulocyte. Les insuffisances qualitatives sont dues principalement à des anomalies portant sur la synthèse de l'ADN ou de l'hémoglobine.

Tableau 1 : Principales causes d'anémie hémolytique chez le chien

■ Origine extra corpusculaire (acquise)

- Agent infectieux parasite de l'hématie
  - Protozoaires : *Babesia canis* et *B. gibsoni*
  - Hémoplasmes : *Mycoplasma haemocanis* [1]
- Agression immunologique
  - Auto-immune, allo-immune ou immuno-allergique
- Substances toxiques et toxines
  - Substances chimiques : paracétamol, bleu de méthylène, benzocaïne, phénazopyridine, phénacétine, méthionine, ails et oignons, brocoli, propylène glycol, zinc, cuivre, plomb, argent, arsenic, vitamine K3 (> 5 mg/kg/j)
  - Toxines (hémolysines) bactériennes : septicémie, *Clostridium haemolyticum*, *Leptospira icterohaemorrhagia*
  - Venins
- Agression mécanique
  - Hémangiosarcome, vascularites et microangiopathies, CIVD

■ Origine corpusculaire (congénitale)

- Anomalies de la membrane érythrocytaire
  - Stomatocytose héréditaire ou maladie de Minkowski-Chauffard (Schnauzer nain et moyen, Alaskan malamute – associé à un nanisme chondrodysplasique –)
  - Elliptocytose héréditaire (races croisées, Silky terrier)
  - Macrocytose (Caniches nain et toy)
  - Sphérocytose héréditaire (Golden retriever)
  - Anémie hémolytique héréditaire non sphérocytaire (Beagle, Caniche nain)
- Anomalies enzymatiques
  - Déficit en phosphofructokinase (Springer anglais, Cocker, races croisées)
  - Déficit en pyruvate-kinase (Basenji, Beagle, West Highland White terrier, Cairn terrier, Caniche nain, Teckel, Chihuahua, Carlin, Esquimau nain)
- Anomalies de l'hémoglobine (hémoglobines instables) : Pas d'anomalie actuellement reconnue chez le chien.

[1] *Mycoplasma haemocanis* était jusqu'à présent appelé *Haemobartonella canis*

B. Anémies immunologiques

Une **anémie immunologique** ou à « médiation immune » résulte de la fixation à la surface des globules rouges (GR) ou des précurseurs érythropoïétiques médullaires d'**anticorps**, ce qui diminue leur durée de vie.

La cible des anticorps est le plus fréquemment un déterminant antigénique présent sur le globule rouge circulant (hématie mature). Les anémies immunologiques sont donc classiquement des **anémies périphériques par hyperhémolyse**. La destruction a lieu dans la circulation (hémolyse intra vasculaire) et résulte directement de l'activation du complément jusqu'au complexe lytique C9, soit beaucoup plus souvent dans les macrophages (hémolyse extravasculaire ou hémolyse tissulaire) par exagération du processus normal, les globules rouges sensibilisés étant reconnus par les phagocytes dans différents organes, en particulier la rate et le foie.

Les précurseurs érythropoïétiques sont parfois également la cible des anticorps ; ainsi, parallèlement ou indépendamment d'une atteinte périphérique, ces anémies peuvent avoir un caractère faiblement ou non régénératif. Dans ce cas, l'atteinte des précurseurs peut se traduire par une raréfaction des érythroblastes ou **érythroblastopénie** (aplasie érythroïde pure ou PRCA, « pure red cell aplasia » dans la littérature anglo-saxonne) ou plus fréquemment par des anomalies de maturation (dysérythropoïèse). Ces dernières sont parfois désignées sous le terme d'**anémies centrales par « blocage de stade »** et sont caractérisées par un arrêt de la maturation érythroïde à un stade donné, du fait d'une destruction immunologique des précurseurs médullaires érythroïdes. Sur la base du myélogramme, les stades tardifs des précurseurs érythroïdes semblent être la cible privilégiée de la réaction immunologique dans les formes arégénératives (*Jonas 1987*).

Les deux formes, centrale et périphérique, peuvent être rencontrées de façon isolée ou associée puisque l'attaque à médiation immune peut être dirigée contre un **antigène associé à la maturation**, détruisant ainsi uniquement les précurseurs ou contre un **antigène commun aux précurseurs et aux GR matures**, produisant à la fois une destruction intra-médullaire des précurseurs et une hémolyse périphérique. Le passage d'une forme régénérative à une forme arégénérative a également été décrit chez des chiens atteints d'anémie immunologique arégénérative, ce qui suggère que les anticorps pourraient changer de spécificité pendant l'évolution de la maladie (*Stokol 2000*). Les anticorps pourraient également être dirigés contre les réticulocytes (*Klag 1993*).

L'incidence réelle des anémies hémolytiques immunologiques n'est pas connue chez le chien et est estimée chez l'homme à environ 1 pour 75 000 ou 80 000 (*Rochant 2001, Stewart 1993b*).

II. Classification et origine des anémies immunologiques

A. Selon l'origine et la pathogénie

1. Terminologie utilisée

Les anémies immunologiques se répartissent en trois catégories (*Day 1998a, Honeckman 1996*) (*Tableau 2*).

Mécanisme pathogène	Antigène cible des anticorps	Dénomination	Etiologie associée
Auto-immun	Antigène érythrocytaire normal	AHAI idiopathique	?
		AHAI secondaire	Maladies auto-immunes (dont LES), autres affections (hémopathies malignes), rares médicaments
A médiation immune secondaire	Antigène étranger au GR	AH de type post-infectieux	Virale, bactérienne ou parasitaire
	Complexe immun (xéno-antigène)	AH immuno-allergique	Médicaments (céphalosporines)
		AH paranéoplasique	Affection tumorale
Par alto-immunisation	Antigène de groupes sanguins (allo-antigènes)	Maladie hémolytique néonatale	
		AH post-transfusionnelle	

Tableau 2 : Classification pathogénique des anémies immunologiques

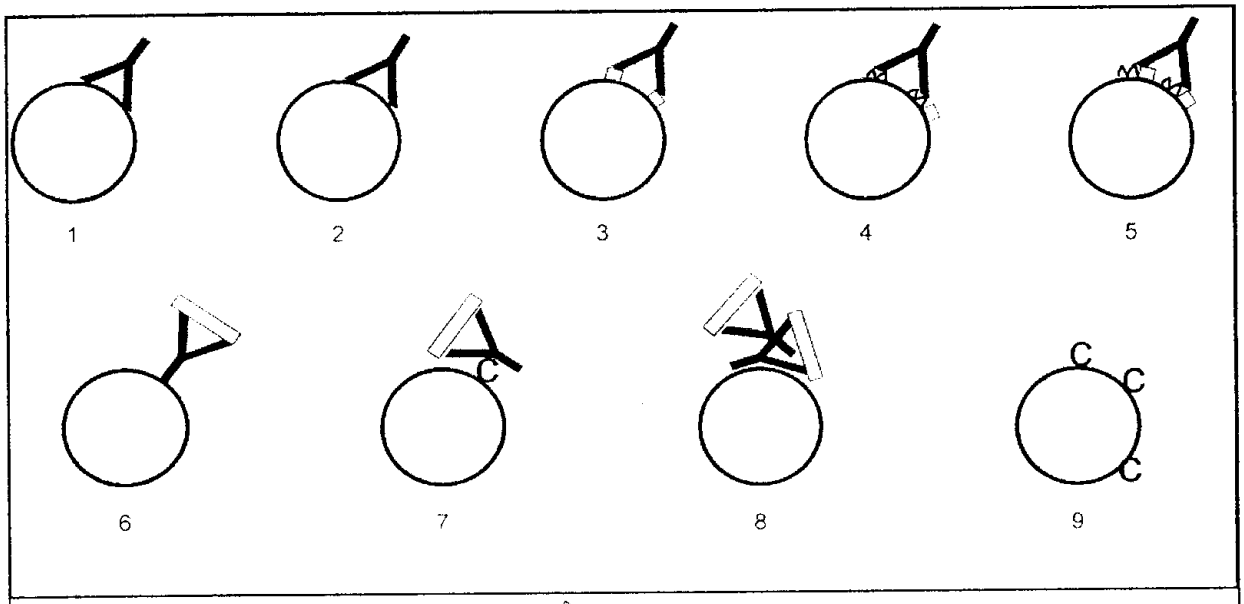
1. Les **anémies hémolytiques auto-immunes (AHAI)** ***sensu stricto*** résultent de la reconnaissance par les anticorps (auto-anticorps) d'un antigène normal de la surface érythrocytaire (auto-antigène).

2. Les **anémies immunologiques secondaires** ou **immuno-allergiques** sont dues à la reconnaissance par les anticorps (Ac) d'un antigène (Ag) qui n'appartient pas à la membrane érythrocytaire normale : antigène autre qu'un antigène du « soi ». Dans ce cas, l'organisme produit normalement des anticorps contre un élément étranger et le globule rouge se trouve être la victime innocente du conflit (*Day 2000, Dodds 1983a*). L'antigène reconnu par le système immunitaire peut être :

   a. Un **xéno-antigène** (médicament, antigène infectieux) fixé sur l'hématie.
   b. Un **néo-antigène**, déterminant antigénique du globule rouge modifié sous l'action d'une maladie intercurrente ou d'un médicament.
   c. Un **antigène cryptique**, déterminant antigénique du globule rouge jusqu'alors caché ou séquestré qui se trouve exposé à la suite d'une modification membranaire (*Stewart 1993a*).
   d. Un **complexe immun** adsorbé à la surface de l'hématie.

3. Les **anémies immunologiques allo-immunes** : dans le cadre particulier des incompatibilités sanguines néonatales (maladie hémolytique néonatale) ou transfusionnelles, les allo-anticorps reconnaissent les antigènes de groupe sanguin (ce type de réaction ne sera pas abordé).

Les différents mécanismes sont récapitulés dans la figure 1, page suivante.



= immunoglobuline

= immun complexe

= antigène adsorbé

 = néo-antigène ou cryto-antigène

Mécanismes de fixation des immunoglobulines (Ig) et du complément (C) sur les hématies

- **1** : **auto-anticorps** (liaison via le fragment Fab des Ig) +/- C, reconnaissance d'un Ag normal de la surface érythrocytaire ;
- **2** : **allo-anticorps** (liaison via le fragment Fab des Ig) +/- C, reconnaissance d'un Ag de groupe sanguin (cas particuliers des incompatibilités sanguines néonatales ou transfusionnelles) ;
- **3** : liaison des **Acs** sur des **xéno-antigènes** adsorbés à la surface des hématies (via le fragment Fab) +/- C ;
- **4** : liaison des **Acs** sur un **néo-antigène** (via le fragment Fab) +/- C ;
- **5** : liaison des **Acs** à la fois à des **xéno-antigènes** et des **néo-antigènes** (via le fragment Fab) +/- C ;
- **6** : fixation **d'immuns complexes** via le fragment Fc des Ig sur des récepteurs Fc, cela est décrit pour les neutrophiles et les plaquettes mais l'existence de ce mécanisme pour les globules rouges est actuellement en cause ;
- **7** : fixation **d'immuns complexes** via le C sur des hématies exprimant des récepteurs pour le C ;
- **8** : **association non spécifique**, peut être médiée par des intégrines, cela peut être observé lors du stockage quand les Acs s'agglomèrent à froid
- **9** : **dépôt de C** de façon passive ou suite à l'élution de l'anticorps

Figure 1: les différents mécanismes de fixation des immunoglobulines et du complément sur les hématies, (d'après *Scott 2000*)

Les anémies immunologiques sont qualifiées de **primaires** (ou idiopathiques) lorsque aucune cause sous-jacente ou maladie associée ne peut être identifiée, au contraire elles sont dites **secondaires** quand elles accompagnent ou se développent parallèlement à un

autre processus pathologique *(Miller 2003)* (*Tableau 3*).
Les anémies immunologiques primaires sont considérées comme les plus fréquentes chez le chien puisqu'elles regroupent **60 à 75 % des cas** (*Fournel 1994, Stewart 1993b, Thébault 2005*). Chez l'homme, seulement 25 à 40 % des cas sont considérés comme idiopathiques (*Stewart 1993b*).

Cette classification en primaire et secondaire ne préjuge pas du mécanisme pathogénique à l'origine de l'anémie, mais seulement de l'existence ou non d'une affection intercurrente. Bien que pratique, elle est à l'origine de confusion avec le mécanisme pathogénique (*Tableau 2*). Ainsi, les anémies immunologiques primaires ou idiopathiques sont le plus souvent assimilées à des anémies hémolytiques auto-immunes alors que la présence d'auto-anticorps anti-hématie n'est pas systématiquement démontrée (*Scott 2000*). Inversement, un mécanisme auto-immun peut être prouvé dans un certain nombre d'anémies immunologiques qui surviennent en parallèle d'autres affections, comme par exemple lors de lupus érythémateux systémique (LES) ou suite à la prise de certains médicaments comme l'alpha méthyl-dopa. Un mécanisme auto-immun est parfois également incriminé au cours de certaines anémies immunologiques paranéoplasiques.

Chez le chien, entre 25 et 42 % des cas d'anémies hémolytiques auto-immunes seraient associés à d'autres manifestations d'auto-immunité *(Cotter 1992)*, parmi lesquelles :

- les **thrombopénies auto-immunes** (syndrome d'Evans) *(Fournel 1994, Lewis 1989, Quimby 1980)* ;
- le **lupus érythémateux systémique** *(Fournel 1994, Lewis 1989, Quimby 1980)* ;
- la **thyroïdite lymphocytaire** *(Day 1996, Giger 2005)* ;
- les glomérulonéphrites, vascularites et polyarthrites à médiation immune *(Klag 1992)* ;
- les **dermatoses auto-immunes**. On observe parfois l'association d'une AHAI avec certaines dermatoses auto-immunes (caractérisées par un dépôt d'immunoglobulines G et de complément à la jonction dermo-épidermique). L'auto-anticorps anti-érythrocyte n'est que l'un des éléments d'un désordre immunologique beaucoup plus étendu, même s'il peut rester cliniquement silencieux par ailleurs *(Fournel 1994)* ;
- l'arthrite rhumatoïde *(Switzer 1981)*.

Récemment, les AHAI ont également été décrites chez le berger allemand (Giger 2005) en association à des affections immunitaires multiples, touchant en particulier les articulations et les reins (Dodds 1977).

Accidents iatrogéniques ou toxiques	- Triméthoprime/sulfamide - Pénicillines - Céphalosporines - Céfazédone (médicament à usage humain) (*Thébault 2005*) - Lévamisole - Anti-inflammatoires non stéroïdiens (phénylbutazone, carprofène) (*Mellor 2005*) - Dipyrone - Quinine et quinidine - Griséofulvine (*Jackson 1985*) - Chlorpromazine - Amiodarone (*Calvert 2000*) - α-méthyl dopa - Pirimicarbe (*Gossett 2000*) - Vaccins - Piqûres d'abeille (*Noble 1999*)
Bactéries	- Leptospirose (*Giger 2005*) - Infections aiguës ou chroniques (abcès, pyomètre, discospondylite, pyélonéphrite, endocardite, colite) (*Day 1998b, Giger 2005, Stewart 1993a*) - Hémobartonellose (chat essentiellement)
Virus	Affections virales transitoires ou chroniques des voies respiratoires supérieures ou du tractus gastro-intestinal (*Giger 2005*)
Affections parasitaires	- Babésiose - Leishmaniose - Dirofilariose - Ehrlichiose et rickettsiose - Bartonellose - Ankylostomose (*Thébault 2005*)
Néoplasies	- Maladies lymphoprolifératives (lymphomes et leucémies, myélomes multiples) - Tumeurs solides : hémangiosarcome, sarcome (*Switzer 1981*, *Mellanby 2004*), carcinome duodénal (*Jones 1975*), mastocytome (*Jackson 1985*)
Maladies immunologiques	- Lupus érythémateux systémique - Hypothyroïdie (*Giger 2005*) - Réactions post-transfusionnelles - Maladie hémolytique néonatale - Sérum anti-lymphocytaire

Tableau 3 : Affections susceptibles de s'accompagner d'une anémie immunologique

2. Origine des anémies auto-immunes

2.1. Définition et origine des maladies auto-immunes

Les **maladies auto-immunes** sont des affections dont les lésions ou les troubles fonctionnels qui les caractérisent, sont provoqués par une **auto-immunisation** primitive et agressive, humorale et/ou cellulaire, liée à l'action pathogène de lymphocytes T et/ou B spécifiques d'auto-antigènes, c'est-à-dire de déterminants antigéniques faisant partie des constituants naturels de l'organisme.

Les critères établissant le caractère auto-immun d'une maladie sont directs et indirects, et l'origine auto-immune d'une maladie n'est pas toujours aisée à démontrer.

Les critères indirects indiquent l'existence d'une réaction immunitaire ou auto-immune contemporaine du développement d'une maladie. L'observation d'un infiltrat de l'organe (ou des organes) atteint(s) par des cellules mononucléées établit la réalité de la réaction immunitaire sans préjuger de son caractère auto-immun. La détection d'auto-anticorps ou de lymphocytes T auto réactifs (prolifération) indique une réaction auto-immune sans établir directement son rôle physiopathologique dans la maladie considérée. L'efficacité thérapeutique de traitements immunodépresseurs et l'existence de modèles dans d'autres espèces animales de la maladie considérée sont également des critères indirects.

Les critères directs sont basés sur la démonstration du transfert de la maladie par les auto-anticorps ou les lymphocytes auto réactifs d'un individu malade au sujet sain.

Ces maladies ont de plus en commun plusieurs caractéristiques :

- Elles surviennent exclusivement chez des **sujets génétiquement prédisposés**, ce qui conduit à rechercher des gènes de susceptibilité en relation notamment avec le complexe majeur d'histocompatibilité.
- Elles ont souvent une **évolution chronique**, **progressive** ou **par poussées**.
- Elles ne sont pas dues à l'action pathogène directe d'un agent infectieux ou toxique ou à une réaction immunitaire contre un allergène de l'environnement, bien que des épisodes infectieux ou des médicaments puissent être impliqués dans leur déclenchement.
- Les traitements actuels visent principalement à contrôler les poussées, ils apportent rarement la guérison.

Les processus physiopathologiques qui conduisent à la rupture des mécanismes de tolérance et par là même aux maladies auto-immunes sont probablement liés à des causes multiples, incluant un trouble immunitaire, l'intervention de facteurs génétiques et hormonaux, le vieillissement et la participation de facteurs exogènes.

Les arguments en faveur d'une composante génétique sont initialement fondés sur des études humaines familiales montrant :
- la concentration de plusieurs cas dans une même famille,
- le taux de concordance plus élevé chez les jumeaux monozygotes par rapport aux dizygotes,
- et une prévalence différente selon les groupes ethniques.

Les modèles animaux confortent ces données initiales. Les maladies auto-immunes apparaissent toutefois génétiquement complexes en raison de l'interaction de nombreux gènes différents. Parmi les gènes de susceptibilité, l'association prédominante et la mieux connue est celle qui lie les maladies auto-immunes et le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). La recherche de gènes de susceptibilité hors de ce complexe est actuellement en cours. Par exemple, certains variants alléliques de gènes codants pour des cytokines pro-inflammatoires

ou pour leurs récepteurs semblent susceptibles d'augmenter la prédisposition à certaines maladies auto-immunes, en agissant sur le niveau d'expression de ces molécules.

Les facteurs hormonaux interviendraient également. Chez l'homme, il existe, en effet, une plus forte prévalence des maladies auto-immunes dans la population féminine. Cette différence tend toutefois à diminuer avec l'âge. La raison de cette incidence relativement élevée chez la femme n'est pas claire mais on sait que les hormones sexuelles peuvent modifier les réponses immunitaires. Le rôle des hormones sexuelles a été objectivé dans certains modèles animaux, notamment dans le modèle murin de lupus érythémateux systémique chez la souris NZBxNZW : chez les souris femelles, la stérilisation retarde la survenue de la maladie, chez les mâles, l'injection d'oestrogènes l'accélère.

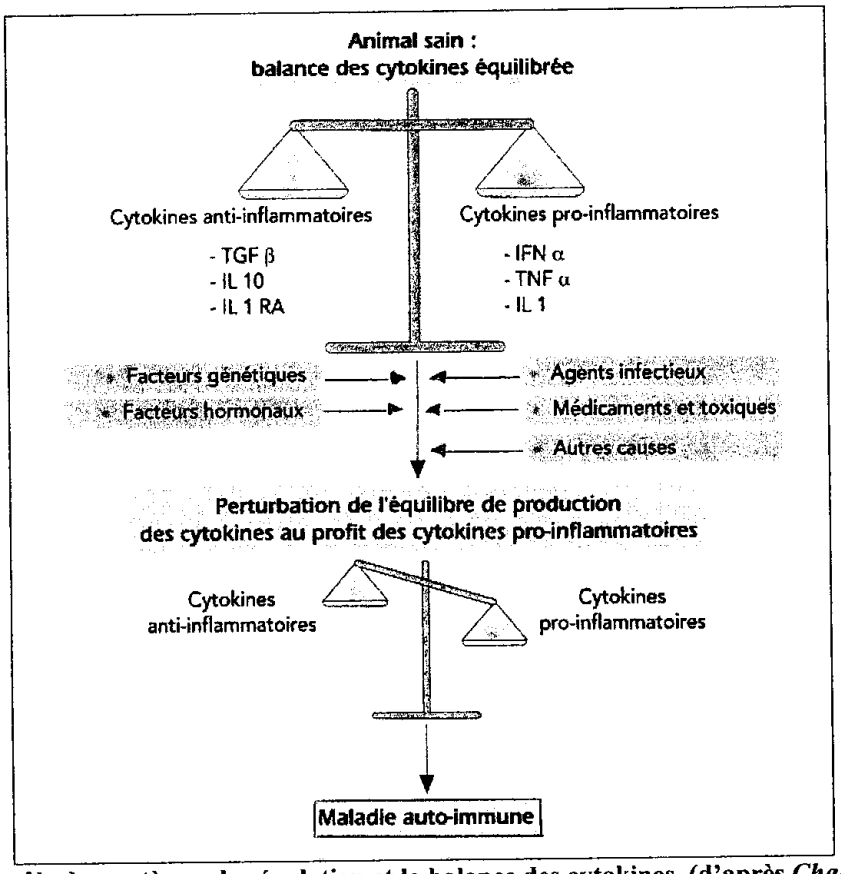


Figure 2 : Le rôle des systèmes de régulation et la balance des cytokines, (d'après *Chabanne 2006a*)

Une perturbation de l'équilibre de production des cytokines au profit des cytokines pro-inflammatoires constitue un facteur de risque ou aggravant de maladie auto-immune.
La production d'interféron gamma (IFNγ), de facteur nécrosant des tumeurs de type alpha (TNFα) et d'interleukine 1 (IL-1) participe à l'initiation et à l'entretien des lésions tissulaires observées dans les maladies auto-immunes.

L'organisme dispose de plusieurs mécanismes immunitaires qui concilient la lutte contre les substances ou organismes étrangers et la sauvegarde du soi. Le système immunitaire apprend à tolérer les cellules et substances propres à l'organisme : **le soi**, de sorte qu'il ne réagit pas contre ces propres constituants.

La reconnaissance spécifique de l'antigène est assurée par les récepteurs des lymphocytes B et T. Certains LB et LT sont spécifiques d'auto-antigènes, c'est-à-dire de déterminants antigéniques faisant partie de l'organisme, qui pourraient être responsables d'agressions pathologiques contre les constituants du soi, c'est-à-dire les propres constituants

de l'organisme. Il existe donc différents mécanismes qui conduisent au phénomène de « tolérance du soi » : un mécanisme central responsable de la sélection négative des clones fortement auto-réactifs et un mécanisme périphérique permettant d'inhiber les LB ou les LT auto-réactifs ayant échappés à la première sélection. La prévention et le contrôle d'une réponse auto-immune nocive chez l'animal en bonne santé résultent donc d'une combinaison de mécanismes qui permettent aux lymphocytes auto-réactifs d'être éliminés ou rendus aréactifs pendant leur différenciation (*Barker 2000*).

La tolérance du « soi » repose sur des mécanismes qui sont acquis au cours du développement des lymphocytes T et B, principalement par l'élimination des lymphocytes auto-réactifs (tolérance centrale). Toutefois, à l'état physiologique, des cellules auto-réactives persistent, si bien que des mécanismes de tolérance périphérique prennent le relais pour éviter leur activation inappropriée.

Dans le thymus, la **sélection positive** permet la survie des thymocytes qui interagissent avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II du soi, tandis que la **sélection négative** aboutit à l'élimination des cellules qui ont une forte affinité vis-à-vis des peptides du soi. Toutefois, certains peptides présentés dans des conditions non optimales (faible affinité, absence de certains co-signaux) induisent **l'anergie clonale** : les lymphocytes T auto-réactifs persistent mais ils ne sont plus fonctionnels. L'anergie est cependant réversible : les cellules T anergiques peuvent être réactivées dans certaines conditions dans les organes lymphoïdes périphériques. Un grand nombre de peptides du « soi » demeurent ignorés au cours de la sélection intra thymique, si bien que le tissu lymphoïde périphérique contient des lymphocytes T spécifiques de ces peptides. Dans la moelle osseuse, plusieurs mécanismes de tolérance interviennent et dépendent du stade de différenciation de la cellule et du stade d'interaction des récepteurs des cellules B avec l'antigène. La **délétion clonale** affecte en priorité les lymphocytes auto réactifs de forte affinité pour l'antigène. Les cellules B auto réactives peuvent échapper à cette sélection négative en modifiant leur récepteur pour l'antigène : c'est le phénomène de réédition.

Les mécanismes de tolérance périphérique sont multiples : par exemple, **l'ignorance immunitaire**. Certains antigènes du soi ne sont exprimés qu'en périphérie et ne sont pas représentés dans le thymus. Dans la mesure où les lymphocytes ne migrent pas dans les tissus solides, ils peuvent très bien ne jamais rencontrer l'auto-antigène. La délétion clonale peut être induite en périphérie lorsque les lymphocytes auto réactifs rencontrent de très fortes doses d'auto-antigènes. L'anergie : le lymphocyte T ne répond pas quand la reconnaissance en périphérie d'un auto-antigène n'est pas accompagnée de signaux de co-stimulation. Les lymphocytes auto réactifs peuvent être rendus inactifs par les **lymphocytes T régulateurs** (*Chabanne 2006b*).

Toutefois, on s'est aperçu très rapidement qu'une immunisation peut aussi se produire contre des constituants qui font partie de l'organisme lui-même. Les limites de la reconnaissance du soi biologique par le système immunitaire apparurent dès 1900, quand Metalnikof parvint à immuniser le cobaye contre ses propres spermatozoïdes injectés dans la cavité péritonéale. Uhlenruth montre en 1901 que le sérum de lapin, auquel on a injecté une suspension de cristallin de boeuf, précipitait les protéines du cristallin. L'immunisation contre les constituants du soi, appelée **auto-immunisation,** peut être nuisible et être responsable de maladies, dites **maladies auto-immunes.** En effet, au-delà des arguments expérimentaux, Donath et Landesteiner amène en 1904 la démonstration de l'existence de maladie auto-immune à travers la description de l'hémoglobinurie paroxystique *a frigore*.

L'auto-immunisation se rapporte aux réactions immunitaires (production d'auto-anticorps et de cellules T) d'un organisme dirigées contre des déterminants portés par ses propres constituants. Ces constituants sont alors nommés **auto-antigènes.** L'auto-immunisation est un mécanisme à priori limité dans l'organisme, celui-ci étant tolérant vis-à-vis de ces propres antigènes.

L'auto-immunité physiologique reste étroitement contrôlée et évite par là même que ne se développent des réactions immunitaires délétères contre les propres constituant de l'organisme. Elle correspond seulement à une auto réactivité qui peut avoir des effets bénéfiques soit en participant à une fonction de voirie (élimination accélérée des auto-antigènes libérés à l'occasion de destructions tissulaires ou cellulaires), soit en concourant à la régulation de la réponse immune (facteurs rhumatoïdes, auto-anticorps anti-idiotype, lymphocytes T auto réactifs,...).

Ainsi, auto-immunisation et maladies auto-immunes ne sont pas synonymes. Selon les cas, l'auto-immunité peut apparaître soit comme un phénomène normal non pathogène, soit comme une réaction anormale pouvant devenir pathogène.
L'auto-immunisation est pathogène lorsqu'elle devient anormale par son intensité et sa capacité à produire des lésions et des troubles fonctionnels. Elle correspond alors à une auto agressivité. C'est un véritable suicide immunologique, l'organisme retournant contre lui-même les systèmes de défense destinés à éliminer les envahisseurs du dehors ou du dedans (cellules néoplasiques). Cette auto-immunité est responsable des maladies auto-immunes. Les maladies auto-immunes (MAI) sont par conséquent des affections dont les lésions ou les troubles fonctionnels qui les caractérisent, sont provoqués par une auto-immunisation primitive et agressive, humorale et/ou cellulaire.

La limite entre l'auto-immunisation physiologique et pathologique peut être illustrée à partir des anémies hémolytiques auto-immunes. En effet, les individus normaux possèdent des lymphocytes T auto réactifs contre leurs propres érythrocytes qui échappent au processus de sélection thymique et sont contrôlés en périphérie pour éviter la survenue d'une affection auto-immune. Lors de la destruction physiologique des érythrocytes sénescents, les cellules phagocytaires présentatrices d'antigènes ne présentent pas certains « déterminants cryptiques » dérivés des antigènes membranaires érythrocytaires, ce qui empêche l'activation de ces cellules T auto réactives. Un des événements permettant l'induction de l'auto-immunité dans le cadre des AHAI, pourrait être une rupture de cette tolérance qui permettrait la présentation de ces peptides et donc l'activation des lymphocytes T auto réactifs. Les chiens normaux hébergent donc des lymphocytes T auto réactifs anti-érythrocytes qui peuvent être activés par un certains nombres de facteurs, endogènes (dysfonctionnement du système immunitaire) et exogènes, ce qui aboutit à la production d'auto-anticorps pathogènes (*Barker 1995, Day 1999*).

2.2. Identification de l'auto-antigène lors d'AHAI

De nombreuses études, ces dernières années, aussi bien chez l'homme que chez le chien, ont eu pour but de rechercher la cible ou les cibles principale(s) des auto-anticorps lors d'anémie hémolytique immunologique afin d'en préciser la pathogénie.

Rappel sur la structure membranaire érythrocytaire chez l'homme

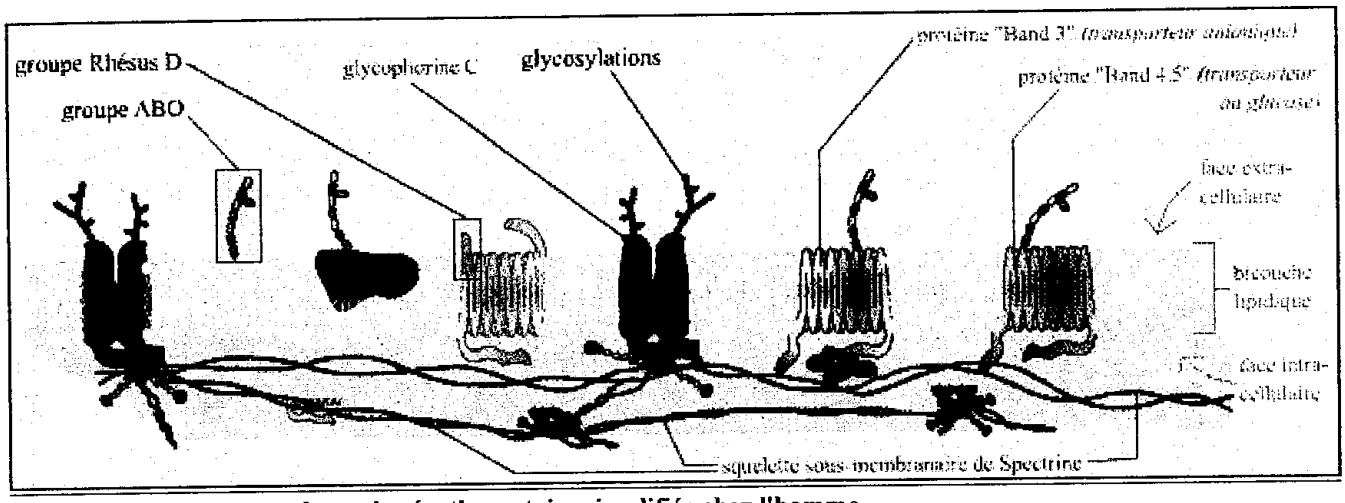


Figure 3 : Structure membranaire érythrocytaire simplifiée chez l'homme

La membrane érythrocytaire *(figure 3)* se compose classiquement d'une double couche fluide de phosphoglycérolipides dans laquelle sont insérées des protéines. Ces protéines peuvent être reconnues par le système immunitaire. Parmi celles-ci, les **glycophorines** sont des oligosaccharides liés à des protéines membranaires, ce sont elles qui sont le support des groupes sanguins du système « ABO » chez l'homme. Les protéines à l'origine du système de groupe rhésus sont également retrouvées en surface.

Chez l'homme, les cibles principales sont habituellement des antigènes de groupes sanguins, le plus souvent des systèmes I /i, rhésus et D *(Fournel 1994)*.

Chez le chien, plusieurs études ont été réalisées pour chercher à identifier la cible des auto-anticorps *(Day 1998b, Day 1999)*.

Les auto-anticorps réagiraient avec les **glycophorines** de la membrane érythrocytaire, la **molécule d'échange des anions** (« bande 3 ») et la molécule de **spectrine** du cytosquelette *(Day 1999, Thrall 2004)*. Ces auto-anticorps seraient aussi impliqués dans la destruction et le recyclage des GR sénescents *(Day 1999)*.
En fonction des études, l'importance accordée à chacune de ces cibles varie.

Pour certains, la cible principale des auto-anticorps serait les **glycophorines** *(Barker 1995)* qui portent les antigènes de groupe sanguin chez l'homme *(Barker 1991)*. Cependant pour d'autres auteurs, ces glycophorines ne semblent pas porter les antigènes de groupes sanguins chez le chien et seraient donc moins impliquées que chez l'homme *(Tsuchida 1991)*.

Dans d'autres études, la molécule membranaire d'échange anionique, la **bande 3** *(Day 1999)* jouerait un rôle très important dans la pathogénie des anémies hémolytiques immunologiques. Christian a montré que de nombreux phénomènes (dénaturation de l'hémoglobine, agents chimiques...) conduisaient à une agglomération des composants de cette bande 3. Cette aggrégation permettrait la fixation d'immunoglobulines en rapprochant les sites de fixation des fragments Fab de ces dernières *(Christian 2000)*.

Enfin, certains auteurs ont mis en évidence l'implication de protéines autres que celles précitées. Tsuchida et *al.*, par exemple, ont montré qu'une protéine de la **région protéique 4.1** augmentait lors de la phase aiguë des anémies immunologiques et diminuait ensuite lors de la rémission, en parallèle de la disparition des auto-anticorps, ce qui pourrait suggérer que cette protéine soit la cible des auto-anticorps *(Tsuchida 1991)*.

Miller a suggéré que la cible des auto-anticorps pourrait être un équivalent canin de l'antigène rhésus, un complexe de glycoprotéines nécessaires pour la maintenance de la viabilité érythrocytaire *(Miller 2003).*

Les auto-anticorps qui caractérisent l'affection canine sont hétérogènes dans leur classe et leur spécificité, suggérant que plusieurs mécanismes sous-jacents puissent être impliqués dans le développement de la maladie.

3.Origine des anémies immunologiques secondaires

3.1. Agents infectieux

a. Principaux agents impliqués

Un certain nombre d'agents infectieux (virus, bactéries et protozoaires) ont été mis en cause dans la survenue des anémies immunologiques, comme facteurs étiologiques ou facteurs déclenchants. Les recherches en ce sens se poursuivent, en raison de leurs conséquences sur la prévention, voire de stratégies thérapeutiques nouvelles.

A l'inverse, des arguments convergents indiquent que l'augmentation de l'incidence des maladies auto-immunes dans les pays développés pourrait être liée à la diminution des infections observée parallèlement dans ces mêmes pays. L'effet protecteur de ces infections pourrait faire intervenir des phénomènes de compétition antigénique ou la production de cytokines régulatrices (et non pas pro-inflammatoires) *(Chabanne 2006a).*

Les principaux agents impliqués lors d'anémie immunologique sont :

- Des virus

Chez l'homme, les infections virales de l'enfant suivies d'anémie immunologique sont principalement des rhinopharyngites, des pneumopathies aiguës et des syndromes grippaux, sans preuve formelle toutefois d'un lien de cause à effet. Une anémie immunologique pourrait également se développer suite à une mononucléose infectieuse, une hépatite virale, une infection à cytomégalovirus, paramyxovirus (*Stewart 1993a*), herpès virus, virus Eptein Barr ou parvovirus B 19. Les anémies immunologiques ne sont pas une manifestation courante dans l'infection liée au virus de l'immunodéficience humaine (*Rochant 2001*).

Chez le chien, le rôle des virus est beaucoup moins étudié et moins connu. Il semblerait que des anémies immunologiques puissent faire suite à des affections virales transitoires ou chroniques des voies respiratoires supérieures ou du tractus gastro-intestinal sans que la preuve formelle de leur association n'ait été apportée (*Giger 2005*).

- Des bactéries

Chez le chien, les bactéries impliquées peuvent être :

➢ Spécifiques

- rickettsies : Rickettsioses, Ehrlichioses;
- bartonelles ;
- hémoplasmes;
- leptospires.

➢ Non spécifiques

La majorité des infections aiguës ou chroniques (abcès, pyomètre, discospondylite, pyélonéphrite, endocardite, colite) semble pouvoir être associée à des cas d'anémie immunologique (*Day 1998b, Giger 2005, Stewart 1993a*)

Chez l'homme, des cas de pneumopathies atypiques à mycoplasmes (*Rochant 2001*), d'infections à *Chlamydia pneumoniae* et de tuberculose (*Sokol 1981*) ont été rapportés en association à des anémies immunologiques. Il semblerait également que de façon similaire à ce qui est observé chez le chien, un certain nombre d'infections non spécifiques puissent y être associé.

- Des protozoaires

L'association d'une anémie immunologique et d'une piroplasmose ou d'une leishmaniose est rapportée.

- Des nématodes : dirofilariose, ankylostomose (*Thébault 2005*).

b. Mécanismes

Les agents infectieux sont fréquemment impliqués dans le développement des AHMI et différents mécanismes sont suspectés (*Day 1998a*).

Ainsi, les agents infectieux peuvent :

➢ posséder des **déterminants antigéniques communs** avec les hématies, entraînant des réactions immunologiques croisées (*Hagedorn 1988*). Il existerait donc un « mimétisme moléculaire » entre certains agents infectieux et les peptides du soi (*Day 1999*).

➢ **altérer des déterminants antigéniques érythrocytaires** alors reconnus comme étrangers au « soi ». Par exemple, le virus Epstein-Barr induit des changements de l'antigène i, les mycoplasmes font de même au niveau de l'antigène I ce qui peut entraîner une affection immunologique médiée par les IgM (*Stewart 1993a*).

➢ permettre **l'exposition d'antigènes cryptiques**, qui pourraient alors être reconnus par le système immunitaire (*Giger 2005*).

➢ être responsable de la formation de **complexes immuns** qui pourraient ensuite adhèrer à la membrane érythrocytaire (*Cotter 1992*)

➢ ou enfin activer le **système immunitaire** (*Day 1998a, Barker 2000*). En effet, durant une infection ou une inflammation, une activation non spécifique du système immunitaire peut survenir et il est maintenant admis qu'une infection microbienne joue un rôle important dans l'induction des affections auto-immunes. Des individus cliniquement normaux possèdent des lymphocytes circulants qui sont programmés pour reconnaître des antigènes du soi, mais ces cellules sont normalement incapables de réagir avec ces auto-antigènes (tolérance au soi). Une altération de cette immunorégulation autorise l'infection et peut conduire à une perte de la tolérance au soi et par conséquent à l'expression d'une maladie auto-immune (*Giger 2005*). Par exemple, des souris infectées avec des particules du virus de la chorioméningite lymphocytaire développent une AHMI transitoire. Dans cet exemple, l'anémie n'est pas due aux anticorps qui réagissent avec un épitope commun au

virus et aux GR, mais à de véritables auto-anticorps spécifiques des GR. L'induction de cette réponse immunitaire serait due à une activation inappropriée des lymphocytes T auto réactifs par des peptides dérivés du virus qui sont similaires au niveau moléculaire aux peptides dérivés des GR (*Day 2000*). Par ailleurs, l'activation de lymphocytes auto réactifs pourrait résulter d'une exposition à des cytokines inflammatoires ou à des épitopes du soi antérieurement cachés (*Barker 2000*).
Lors d'une infection chronique, il y a également une activation des macrophages et ils semblent que ceux-ci expriment alors plus de récepteurs pour les IgG et le C3 et donc que l'hémolyse soit facilitée. C'est pourquoi des épisodes d'hémolyse chez certains patients atteints d'AHAI accompagnent souvent une atteinte infectieuse (*Schreiber 1977*). Enfin, Meite a mis en évidence une augmentation de la pathogénicité des anticorps anti-érythrocytes chez des souris infectées expérimentalement avec un virus. Des analyses *in vitro* et *in vivo* montrent, en effet, une augmentation importante de la capacité des macrophages à phagocyter les GR liés à des anticorps chez les souris infectées. Ceci indique que les virus pourraient amplifier la survenue d'une affection auto-immune en augmentant la pathogénicité propre des auto-anticorps (*Meite 2000*).

Chez l'homme, des auteurs ont montré qu'une bactériémie pouvait modifier les antigènes de surface des GR, conduisant à une fixation d'anticorps et donc à une hémolyse. Toutefois, dans une étude soumettant les échantillons sanguins de 12 chiens atteints d'une AHMI à une culture bactérienne aérobie et anaérobie, aucune bactériémie n'a été mise en évidence, cependant les faux négatifs sont nombreux et il est également possible que l'AHMI ait été induite par une infection bactérienne qui soit résolue au moment du prélèvement pour la culture (*Miller 2004*).

3.2. Médicaments et toxiques

a. AHMI secondaires à un traitement médicamenteux

La survenue d'anémie immunologique est rapportée lors de la prise de certains médicaments (*Gossett 2000*).

Les AHMI induites par les médicaments surviendraient suite à trois mécanismes principaux (*Hagedorn 1988, Calvert 2000*) :

- la formation d'anticorps contre le médicament qui se comporte alors comme un **haptène** et se fixe à la membrane érythrocytaire, la réponse immunitaire étant dirigée contre le complexe médicament/GR ainsi formé. Ainsi, quand des doses importantes de **pénicilline** sont administrées à un cheval, les GR peuvent être recouverts de ce médicament, permettant à des anticorps anti-pénicilline produits chez les animaux sensibles, de se lier indirectement à la membrane érythrocytaire. Un mécanisme similaire est suspecté chez le chien.

- la liaison de **complexes anticorps-médicaments** préformés sur la membrane des GR. Le médicament se fixe à une protéine plasmatique et le complexe médicament/protéine peut initier une réponse immune. Le complexe immun qui en résulte peut se fixer de façon non spécifique aux GR, et ce nouveau complexe formé peut être soit détruit par la voie intra vasculaire en fixant le complément, soit par la voie extravasculaire via le système réticuloendothélial. Ceci est par exemple le cas lors d'administration de **céphalosporines** (*Barker 2000*).

- l'induction de véritables **auto-anticorps**. Ainsi, l'agent antihypertenseur, **α méthyl-**

dopa, utilisée en médecine humaine, est un des quelques médicaments dont on a montré qu'il était incontestablement impliqué dans l'induction de la production de véritables auto-anticorps anti-GR. Certaines études suggèrent que ce médicament pourrait induire un changement de conformation au niveau de la membrane érythrocytaire, ce qui exposerait des antigènes jusqu'alors séquestrés ou cachés (*Stewart 1993a*).

Les deux premiers mécanismes requièrent la présence du médicament pour que l'hémolyse ait lieu, le troisième non. Les cas d'AHMI induites par les médicaments ne sont pas décrits fréquemment chez l'animal et relèvent probablement le plus souvent du premier mécanisme (haptène). L'hémolyse résulte de la phagocytose des GR liés aux anticorps anti-médicaments, et généralement les examens complémentaires révèlent une sphérocytose, une auto-agglutination et un test de Coombs positif en présence du médicament. Cependant, un diagnostic de présomption peut être établi en l'absence d'un test de Coombs positif, si les signes d'AHMI disparaissent à l'arrêt de la prise médicamenteuse.

Pour certains médicaments, différents mécanismes pourraient intervenir. Par exemple dans le cas de l'amiodarone, il semble que les trois mécanismes décrits agissent de façon synergique (*Calvert 2000*).

Cependant, les études restent peu nombreuses chez le chien et il n'existe actuellement pas de consensus chez ce dernier sur les différents mécanismes impliqués lors d'anémie immunologique associée à une prise médicamenteuse. Par exemple, si certains suggèrent que l'AHMI induite par les céphalosporines résulte du dépôt de complexes immuns sur les hématies (*Barker 2000*), d'autres pensent que ce médicament pourrait être impliqué dans la formation de véritables auto-anticorps (*Stewart 1993a*). Un effet suppressif sur la moelle osseuse pourrait également être en jeu lors d'administration de céphalosporines.

Par ailleurs, les réactions adverses médicamenteuses sont difficiles à prouver. Un des tests est de re-soumettre l'animal au même médicament, mais cela peut avoir une issue grave et est donc peu réalisé (*Mellor 2005*). D'autres tests existent en médecine humaine mais sont rarement utilisés en médecine vétérinaire.

Bien que les AHMI induites par un traitement médicamenteux semblent rares chez le chien et les mécanismes mal connus, plusieurs auteurs recommandent de considérer toute médication chez un chien qui développe par la suite une AHMI comme suspecte et si possible de l'arrêter (*Cotter 1992*).

b. AHMI secondaires à une vaccination

❖ Mise en évidence

Une vaccination récente a été incriminée dans le développement des AHMI chez le chien (*Gossett 2000, Dodds 1983a*) et chez l'homme, mais les preuves de cette association manquent, et les différentes études diffèrent (*Carr 2002*).

Dans une étude rétrospective de Duval et Giger (*Duval 1996*) réalisée sur 58 chiens atteints d'AHMI idiopathique, un quart (26%) de ces chiens a été vacciné dans le mois précédant la survenue de l'affection (en moyenne 13 jours, médiane 14 jours, intervalle entre 1 et 27 jours). Dans le groupe témoin (70 chiens choisis au hasard et présentés pour une raison autre qu'une AHMI), il n'y a pas d'augmentation de la fréquence de consultation dans le mois qui suit la vaccination. Toutefois, pour leurs détracteurs, dans cette étude, les auteurs ne font qu'identifier une relation temporelle entre la vaccination et la survenue d'une AHMI chez certains chiens, mais ne prouvent pas l'existence d'un lien de cause à effet (*Elliott 1997*). Dans une autre étude portant sur 146 chiens , il n'y a pas de corrélation entre la survenue

d'une AHAI ou d'un purpura thrombopénique auto-immun et une vaccination récente (*Day 2000, Astrup 1998*).

Il est donc très difficile de savoir s'il existe un lien de cause à effet entre vaccination et AHMI, puisque les seules observations dont on dispose se basent sur un lien temporel. Ainsi, même si les affections se développent rapidement après la vaccination, on ne peut pas savoir s'il s'agit d'une coïncidence ou d'un phénomène de cause à effet. Dans quelques cas, toutefois, une réaction fébrile sévère immédiate avec une destruction à médiation immune des GR et/ou des plaquettes suit la vaccination dans les 24 à 48 heures, ce qui suggère que ces réactions sont clairement liées à la vaccination (*Dodds 1983a*).

Les vaccins impliqués dans l'étude de Duval et Giger sont variés : il s'agit d'une combinaison de vaccins provenant de différents fabricants contre la maladie de Carré, l'adénovirus de type 2, la leptospirose, le parainfluenza et le parvovirus. Ils incluent aussi bien des vaccins à virus vivants modifiés que des vaccins inactivés. Une vaccination contre la rage, contre *Bordetella sp.*, contre les coronavirus et contre la maladie de Lyme, a été réalisée de façon concomitante chez certains chiens (*Duval 1996*).
Les vaccins à virus vivant modifié, notamment le vaccin contre la parvovirose, ont souvent été les plus largement impliqués dans la survenue de complications immunes post-vaccinales, toutefois aucune étude ne prouve actuellement leur rôle puisque des réactions similaires sont observées avec d'autres types de vaccins (*Dodds 1983a*).

❖ Pathogénie

Les thrombopénies immunologiques post-vaccinales ont fait l'objet d'un plus grand nombre d'études que les anémies immunologiques post-vaccinales. Les mécanismes impliqués semblent toutefois être similaires (*Dodds 1983b*) :

- le virus vaccinal pourrait **inhiber** la **thrombopoïèse** au stade mégacaryocytaire. Cependant, chez l'homme, le myélogramme montre une augmentation du nombre de mégacaryocytes, et le frottis sanguin révèle la présence de macrothrombocytes ce qui suggère au contraire une thrombopoïèse accélérée.

- les composants du vaccin pourraient **altérer** ou se **fixer** sur les **membranes** des plaquettes et initier une réponse immune. Toutefois des antigènes de surface communs ou une réaction croisée entre les plaquettes et les constituants des vaccins n'ont pas encore été mis en évidence.

- les particules virales du vaccin pourraient se comporter comme des **haptènes**. Cela parait être le cas chez les chiens infectés expérimentalement avec le virus de la maladie de carré, bien que la spécificité des anticorps liés aux plaquettes n'ait pas été déterminée (*Dodds 1983a*).

- la vaccination pourrait **altérer** la **réponse immunitaire**, et de ce fait les plaquettes seraient détruites par un système immunitaire « hyperactif ». L'injection d'antigènes vaccinaux pneumococciques chez des souris peut, en effet, entraîner une stimulation polyclonale des lymphocytes B, et par conséquent une thrombopénie à médiation immune. Expérimentalement, des médicaments immunomodulateurs comme le lévamisole peuvent réduire l'incidence de la thrombopénie survenant après vaccination des chiens contre la maladie de Carré (*Dodds 1983a*).

- Enfin, les adjuvants vaccinaux, notamment l'aluminium, sont parfois incriminés, en raison de leur effet stimulant de l'immunité (*Chabanne 2006a*).

Chez l'homme, les AHMI induites par la vaccination ont été rapportées chez des enfants vaccinés contre la diphtérie et le tétanos. Ainsi, une fixation d'anticorps sur la surface érythrocytaire et une agglutination sont observées quand des composés vaccinaux contre la diphtérie ou le tétanos sont ajoutées aux GR de personnes en bonne santé, et de personnes ayant développé une AHMI associée à la vaccination. Les anticorps impliqués ont une spécificité antigénique dirigée contre les différents constituants de ces vaccins. Ceci est en faveur d'une réaction immune, avec la formation d'anticorps contre la membrane érythrocytaire à laquelle sont fixés les composants du vaccin. Chez des modèles murins pour les AHMI, la destruction des GR est beaucoup plus rapide si le système immunitaire du cobaye est au préalable stimulé avec le bacille de Calmette et Guérin (BCG). Ceci suggère que la stimulation immune et l'activation macrophagique, telles qu'elles peuvent être induites par la vaccination, pourraient également exacerber une AHMI pré existante.

Il est donc difficile de savoir si les composants du vaccin induisent la production d'auto-anticorps, ou si les macrophages du système immunitaire sont activés par la vaccination pour détruire des GR sur lesquels des anticorps sont déjà fixés. Il apparaît plus probable que les vaccins amplifient ou « réveillent » un processus immun sous-jacent, plutôt qu'ils soient la cause véritable des AHMI (*Giger 2005*). Les chiens qui ont développé une AHMI induite par la vaccination peuvent présenter une rechute si la même vaccination est réalisée, comme cela est observé chez l'homme (*Duval 1996*).

c. *AHMI secondaires à une envenimation*

Des AHMI secondaires à de nombreuses **piqûres d'abeilles** ont été rapportées en Afrique du sud, mais peu de cas sont décrits aux Etats-Unis, et aucun cas en France.

Cette réaction toxique nécessiterait de nombreuses piqûres et dépendrait des composants du venin. Les composants les plus hémolytiques du venin sont la phospholipase A et la méllitine, cette dernière étant la plus abondante. Ces deux agents entraînent une fragilité excessive de la membrane érythrocytaire et par conséquent une hémolyse, la **méllitine** en réduisant les tensions de surface, la **phospholipase A** en altérant la structure lipidique des GR. Les effets de l'envenimation peuvent être immédiats ou différés de quelques jours.

Même si l'anémie hémolytique rencontrée lors d'envenimation semble être d'origine **toxique ou mécanique**, des publications récentes font état de résultats positifs au TCD et d'une réponse au traitement corticoïde lors de telles anémies, ce qui semble indiquer l'existence d'un mécanisme **immunologique**, qui agirait seul ou en association à une hémolyse d'origine toxique (*Noble 1999*).

d. *AHMI secondaires à une intoxication*

Lors d'une intoxication au zinc, celui-ci provoquerait une agrégation de la « bande 3 » située sur la membrane érythrocytaire, ce qui permettrait la fixation d'anticorps à ce niveau et par conséquent une hémolyse immunologique pourrait survenir. Mais chez les chiens présentant une telle intoxication, le test de Coombs direct est le plus souvent négatif. Une hypothèse est que lors de la procédure de lavage des érythrocytes, le zinc est séparé de la membrane érythrocytaire, d'où le retour de la « bande 3 » à une forme non agrégée et l'élution des anticorps (*Thrall 2004*).

3.3. Pathologie tumorale

❖ Mise en évidence

Les AHMI peuvent être associées occasionnellement, chez l'homme et chez le chien, à des tumeurs malignes (*Cotter 1992*), de nature variée : leucémie, lymphome, tumeur gastrique, carcinome pulmonaire (*Jones 1992*), mastocytome (*Jackson 1985*), chondrosarcome (*Switzer 1981*), sarcome thoracique (*Mellanby 2004*), léiomyosarcome du jéjunum, tumeurs ovariennes et sarcome de Kaposi chez l'homme (*Mellanby 2004*). Cette liste n'est pas exhaustive.

Les affections lymphoprolifératives sont toutefois les tumeurs les plus fréquemment associées aux AHMI chez l'homme (*Mellanby 2004*) et chez le chien.

❖ Pathogénie

La pathogénie de l'association entre les AHMI et les néoplasies est encore mal connue chez l'homme comme chez l'animal. Cela pourrait être un hasard, cependant même si cela peut être le cas chez une minorité de patients, l'incidence de la cœxistence des deux affections apparaît trop grande pour n'être qu'une coïncidence. Par ailleurs, chez l'homme, dans certains cas, le traitement de la tumeur conduit à une résolution de l'anémie (*Mellanby 2004*).
Différents mécanismes physiopathologiques sont évoqués, notamment dans le cadre de l'association entre une anémie immunologique et une maladie lymphoproliférative, pour expliquer cette association :

- un clone de cellules B peut produire des auto-anticorps pathogènes. La convergence au niveau des lymphocytes B d'évènements successifs, les uns génétiques (en particulier des anomalies de gènes contrôlant l'apoptose des lymphocytes), hérités ou acquis, les autres environnementaux (stimulation chronique par un antigène), concourt, à la fois, à la survenue du processus auto-immun, et à celle du processus lymphoprolifératif ;
- un clone malin peut produire des médiateurs à l'origine d'une réaction inflammatoire ou d'une destruction tissulaire. Il peut notamment sécréter des cytokines induisant l'activation lymphocytaire B (IL-6, IL-10) ;
- lors de la réaction anti-tumorale, l'organisme peut produire des médiateurs dirigés contre l'antigène exprimé par la cellule tumorale, qui peut aussi être un antigène érythrocytaire normal, d'où une réaction immunologique croisée (*Chabanne 2006a*).

B. Selon la nature du revêtement anticorps et ses conséquences

Prenant en compte les caractéristiques des anticorps présents à la surface des hématies (notamment les propriétés agglutinante ou hémolytique) et leurs conséquences physiopathologiques, il est également possible de proposer une classification immunologique (*Lewis 1989, Miller 2003, Stewart 1993a, Switzer 1981*).

Cette classification repose sur plusieurs critères :
-le comportement thermique des anticorps impliqués (Ac chauds/Ac froids),
-la classe des Ac impliqués (IgG ou IgM),
-les propriétés agglutinante ou hémolytique des Ac impliqués.

Une classification synthétique a ainsi pu être réalisée et cinq classes principales d'AHMI sont aujourd'hui distinguées (*Fournel 1994, Stewart 1993a*).

Classe	Nom des Ac	Classe de l'Ac	C	Diagnostic	Site majeur de destruction des GR	Devenir des GR	Commentaires
I	Auto-agglutinines	-IgG à fort titre -IgM	_	Agglutination spontanée à 37°C	Extra vasculaire	Agglutination intra vasculaire puis phagocytose	-Evolution suraiguë -Pronostic grave
II	Hémolysine	IgM (IgG)	C1→ C9	-Agglutination spontanée à 37°C -TCD à 37°C	Intra vasculaire	Hémolyse (lyse osmotique par C)	-Evolution aiguë ou suraiguë -Anémie sévère -Hémoglobinémie -Hémoglobinurie
III	Anticorps incomplets	IgG	C1→ C_3b	TCD à 37°C	Extra-vasculaire (rate)	phagocytose	-Evolution aiguë ou chronique -Le plus fréquent
IV	Agglutinines froides	IgM (rarement IgG)	C1→ C_3b	Agglutination spontanée à 4°C	Extra-vasculaire (foie)	Agglutination intra vasculaire puis phagocytose	-Evolution chronique -Cyanose, nécrose des extrémités (doigts, nez, oreilles)
V	Hémolysine froide	IgM (rarement IgG)	C1→ C9		Intra-vasculaire	Hémolyse (lyse par C)	-Evolution chronique -Hémolyse à froid

Tableau 4 : Classification immunologique des anémies immunologiques, d'après (*Fournel 1994, Lewis 1989, Stewart 1993a*)

1.Selon le site de destruction

La voie de destruction des GR dépend de différents facteurs, parmi lesquels la sous-classe de l'anticorps, son affinité, son titre, son comportement thermique, l'activation ou non du complément et le degré d'activation du système phagocytaire.

Rappel sur le complément

Le système du complément comprend un grand nombre de **protéines plasmatiques** dont les activités sont révélées par une succession de clivages enzymatiques en cascade générant des fragments capables de réagir avec des récepteurs cellulaires spécifiques.
Il existe deux voies d'activation :

- la **voie classique** dont l'activation nécessite la reconnaissance spécifique de la cible par un anticorps (IgM ou IgG). Cette voie commence par l'agglomération du composé C1 entre les sites de fixation d'une molécule d'IgM ou de 2 molécules d'IgG proches ;
- la **voie alterne** qui repose sur un mécanisme non spécifique de reconnaissance de la cible. Cette voie peut être activée par les bactéries, les lipopolysaccharides, les IgA, les IgE et les IgG.

L'activation par l'une ou l'autre des voies conduit à l'apparition d'une **C3 convertase** qui clive le fragment C3 en deux petits fragments : **C3b** qui adhère à la particule cible, ici le globule rouge et **C3a**, une anaphylatoxine efficace qui entraîne la libération d'histamine des mastocytes et qui est chimiotactique pour les neutrophiles.

Opsonisation de la phagocytose des GR
Lorsqu'elle est recouverte de C3b, la cible peut être fixée aux macrophages et aux polynucléaires qui possèdent un récepteur pour le fragment C3b, ce qui facilite sa phagocytose : c'est le phénomène d'opsonisation.
Le fragment C3b peut être clivé par un inactivateur du C3b (protéine naturellement présente dans le plasma) en C3c et C3d. Le C3d peut rester sur le GR. Cependant, les macrophages n'ont pas de récepteurs pour le C3d. Par conséquent, les GR atteints par l'agression initiale et sur lesquels est fixé uniquement le C3d peuvent néanmoins avoir une durée de vie normale (*Schreiber 1977*).

Formation du complexe d'attaque membranaire
Dans certains cas, C3b s'unit avec C2 et C4 pour former la C5 convertase. La C5 convertase clive ensuite C5 en deux fragments : C5a et C5b. C5b en adhérant à la particule cible, permet l'activation successive des facteurs C6, C7 et C8. Le complexe ainsi formé catalyse la polymérisation du facteur C9 dans le membrane de la cible, ce qui forme alors un pore membranaire responsable de l'entrée d'eau et de sodium provoquant une lyse cellulaire : c'est le complexe d'attaque membranaire (CAM) (*Stewart 1993a*).

Encadré 1 : Rappel sur le complément

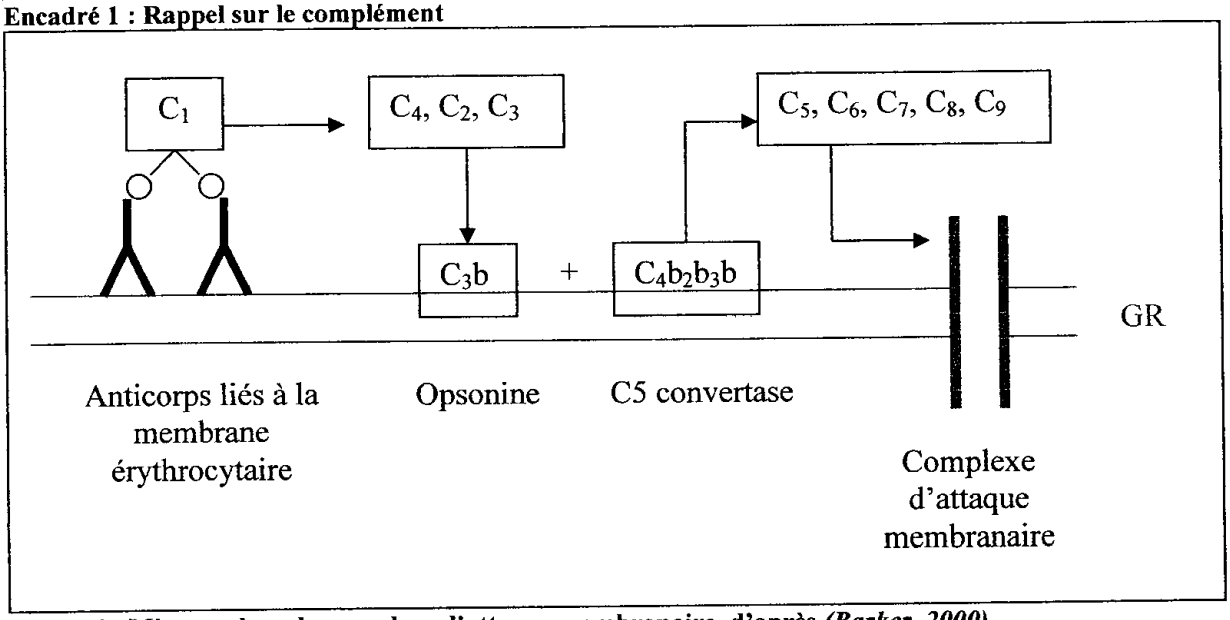


Figure 4 : Mise en place du complexe d'attaque membranaire, d'après *(Barker 2000)*

1.1. Agglutination intra-vasculaire

L'agglutination intra vasculaire survient quand des anticorps créent un « **treillage de GR** ». Les anticorps se comportent en quelque sorte comme un pont qui relie les GR circulants au sein d'un **agglutinat** qui est par la suite phagocyté par le système des phagocytes mononuclés. Cette méthode de destruction prématurée peut être médiée par un **haut titre en IgG** ou un **faible titre en IgM**.

L'importance de la sous-classe d'anticorps est liée à la distance entre deux sites de fixation des antigènes. Pour les IgG, monomériques, la distance maximale entre deux sites de fixation des antigènes est de 12,5 à 25 nm, ce qui limite la liaison potentielle de ces anticorps au sein d'un agglutinat. Par conséquent l'agglutination survient seulement quand les IgG sont présentes en grand nombre. Au contraire, les larges molécules d'IgM, pentamériques, ont une distance de 30 à 50 nm entre deux sites de fixation des antigènes, ce qui augmente leur fonction agglutinante. L'agglutination intra vasculaire se produit dans les **classes I et IV** *(Lewis 1989)*.

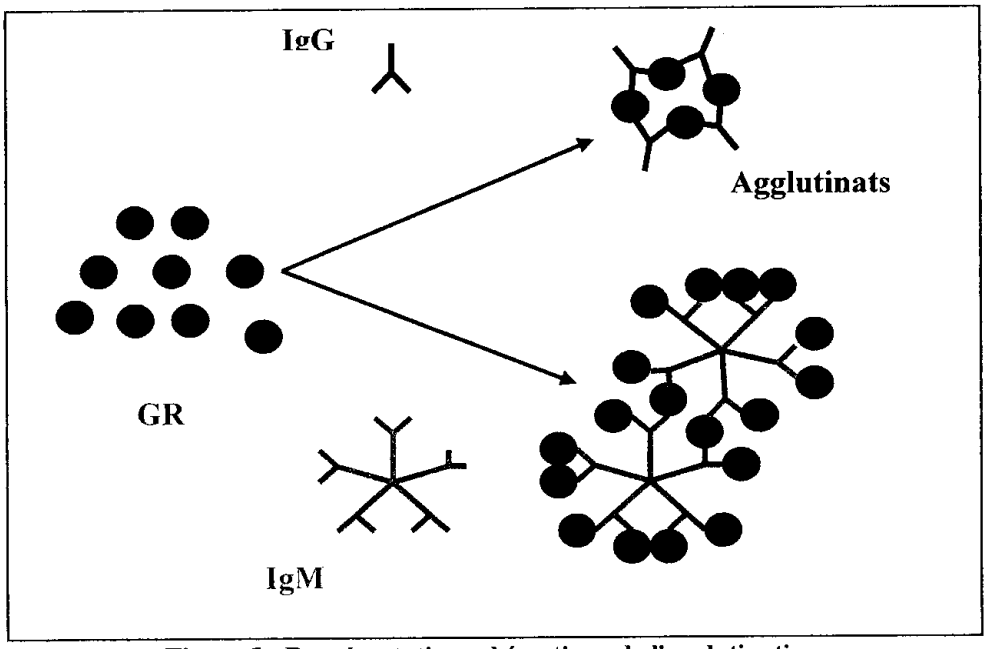


Figure 5 : Représentation schématique de l'agglutination

1.2. Hémolyse intra-vasculaire

L'activation et la fixation des protéines du complément sur les GR joue un rôle important dans les AHMI. Cela peut conduire à une hémolyse intra vasculaire immédiate ou amplifier l'hémolyse extravasculaire.

L'hémolyse intra vasculaire est **rare** et correspond à environ **10 à 20 %** des AHMI *(Miller 2003)*. Elle résulte de **l'activation complète** du **complément** par la voie classique de C1 à C9 à la surface des hématies, ce qui aboutit à la formation du « **complexe d'attaque membranaire** » *(figure 4)* d'où une hémolyse intravasculaire aiguë (*Barker 2000*) et la libération des divers constituants de l'hématie, notamment l'hémoglobine, dans la circulation sanguine, ainsi que la formation de substances vasoactives ou chimiotactiques pouvant être nocives (*Cotter 1992*). Ce phénomène s'observe avec des anticorps (IgG ou IgM) qui fixent le complément et ont une activité hémolytique marquée (*Thébault 2005*).

Les **IgM** prédominent dans ce mécanisme car elles ont une capacité intrinsèque à activer le complément meilleure que celle des IgG (*Lewis 1989*). En utilisant des cobayes, Schreiber a démontré que 60 molécules d'IgM pouvaient générer 60 sites de fixation pour le composé C1, nombre nécessaire pour la diminution de la durée de vie des GR (*Schreiber 1977, Stewart 1993a*). Cependant, les IgM sont plus communément présentes en concentrations « sub-lytiques », et des protéines de régulation inhibitrices peuvent empêcher l'activation complète du C, ce qui explique que l'hémolyse extra vasculaire survienne plus fréquemment en présence d'IgM et que l'hémolyse intra-vasculaire reste rare (*Giger 2005*).

1.3. Hémolyse extravasculaire

L'hémolyse extravasculaire implique des anticorps qui fixent incomplètement le C et ne sont pas agglutinants. Ce mécanisme correspondant à la **classe III** est **le plus fréquent** lors des AHMI canines. Les **anticorps** sont dits **incomplets**, car ils sont incapables d'induire l'agglutination des GR *in vivo* ou *in vitro*. Ces anticorps sont principalement des **IgG** qui, du fait de leur structure monomérique, ne peuvent pas, dans les conditions habituelles, agglutiner les GR directement sauf si un grand nombre d'anticorps est présent. Les immunoglobulines fixées sur la membrane érythrocytaire peuvent interagir avec des récepteurs du fragment constant (Fc) de leur chaîne lourde, exprimés par les phagocytes (principalement les macrophages). Cela aboutit à une destruction des GR dans des sites extravasculaires comme la rate et le foie (ou plus rarement la moelle osseuse) : il en résulte par conséquent une hémolyse extravasculaire (*Day 2000, Fournel 1994, Stewart 1993a*). Toutefois, certains GR phagocytés sont seulement partiellement dégradés et sont ensuite relâchés dans la circulation sous forme de **sphérocytes**, qui se différencient morphologiquement des GR par leur taille plus réduite et l'absence de pâleur centrale. Ils ont, du fait de leur rigidité, un **temps de vie plus court** que les GR normaux car ils sont détruits plus rapidement lorsqu'ils traversent la rate ou le foie.

Les macrophages possédant de nombreux récepteurs pour le fragment constant (Fc) des molécules d'IgG sont retrouvés essentiellement dans la pulpe rouge de la **rate**, c'est pourquoi cette érythrophagocytose se traduit prioritairement par une **splénomégalie**. Pour certains auteurs, les GR fixés aux IgG seraient également détruits par un mécanisme de cytotoxicité directe anticorps dépendant lorsqu'ils traversent la rate (*Schreiber 1977*).

Toutefois, les immunoglobulines peuvent également fixer le complément, qui peut alors être reconnu par des récepteurs exprimés par les phagocytes, ce qui amplifie l'hémolyse extravasculaire. Ainsi, lors d'anémie médiée par des IgG, si la production d'immunoglobulines se poursuit, il y a fixation du complément sur la surface érythrocytaire et l'érythrophagocytose peut également se produire dans le **foie**, et se traduire par une **hépatomégalie** *(McCullough 2003, Stewart 1993a)*. En effet, le **composant C3b** ainsi fixé à la surface de la membrane érythrocytaire est principalement reconnu par les récepteurs des macrophages hépatiques : les **cellules de Küpffer** (*Giger 2005*). Une étude réalisée sur des cobayes a démontré que 800 à 2 000 molécules d'IgG étaient nécessaires pour générer un site unique de fixation du composé C1, ce qui explique que le nombre de sites d'activité de C1 augmentent de façon proportionnelle au nombre d'anticorps (*Stewart 1993a*). Par ailleurs, il semblerait que certaines molécules d'IgG soient capables d'activer le complément et pas d'autres. Certaines études en médecine humaine suggèrent que cela pourrait être du à la cible antigénique des IgG : si les antigènes cibles sont éloignés les uns des autres sur la surface érythrocytaire, les IgG ne pourraient pas activer le C, car le site de fixation du C sur les IgG

requiert un doublet d'IgG, donc nécessite que deux molécules d'IgG soient côte à côte (*Schreiber 1977*).

Les IgM peuvent également conduire à une **hémolyse extravasculaire**. Bien que certaines études considèrent qu'il existe des récepteurs pour les fragments Fc des IgM au niveau du foie (*McCullough 2003, Stewart 1993a, Lewis 1989*), de nombreux auteurs s'accordent sur le fait que l'érythrophagocytose médiée par les IgM est entièrement dépendante du complément (*Cotter 1992, Giger 2005, Switzer 1981*). En effet, les GR liés à des IgM chez des modèles animaux expérimentaux qui sont déficients en complément ont une durée de vie normale, même si de très fortes concentrations en IgM sont présentes, donc le C serait indispensable à la clearance des GR liés à des IgM, les macrophages semblant ne pas avoir de récepteurs pour les IgM. L'érythrophagocytose des hématies recouvertes par des IgM fixant le C est hépatique, de la même façon que celle décrite précédemment. Toutefois, parmi les GR liés à des IgM et séquestrés dans le foie, certains sont phagocytés (environ 20%) mais la majorité sont relibérés dans le sang où ils survivent normalement même s'ils possèdent encore des IgM en surface et le composé C3. Ceci conduit à un résultat positif au test de Coombs. Cette libération n'est pas du à une élution des anticorps de la surface érythrocytaire mais plutôt à une transformation du C3b en C3d qui reste fixé à la surface érythrocytaire mais n'est plus reconnu par les récepteurs macrophagiques (*Schreiber 1977*). Par ailleurs, les GR possédant ce C3d en surface semblent en partie protégés contre la fixation de nouvelles molécules de C3, par saturation des sites membranaires (*Fournel 1994*).

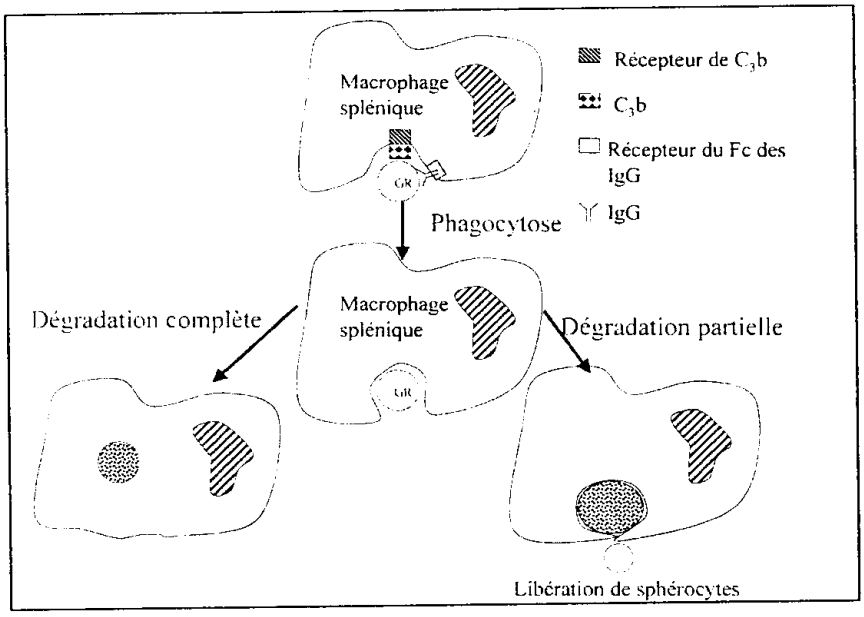


Figure 6 : Mécanisme de destruction extravasculaire des GR

En conclusion, **l'érythrophagocytose extravasculaire** constitue le mécanisme pathogénique prépondérant lors d'AHMI chez le chien. L'hémolyse est causée par des **IgG** (classe III) ou des **IgM** (classe IV) qui se fixent, via leur fragment constant, sur les sites récepteurs du système réticulo-endothélial (SRE). Les phagocytes impliqués sont : les **monocytes sanguins**, les **cellules de Küppfer** (macrophages hépatiques) et les **macrophages spléniques**.

La destruction des hématies dans la circulation est plutôt rare. Elle correspond aux AHMI des classes II et V et s'explique par l'activation complète du complément par voie classique (C1-C9), permettant la mise en place du complexe d'attaque membranaire.

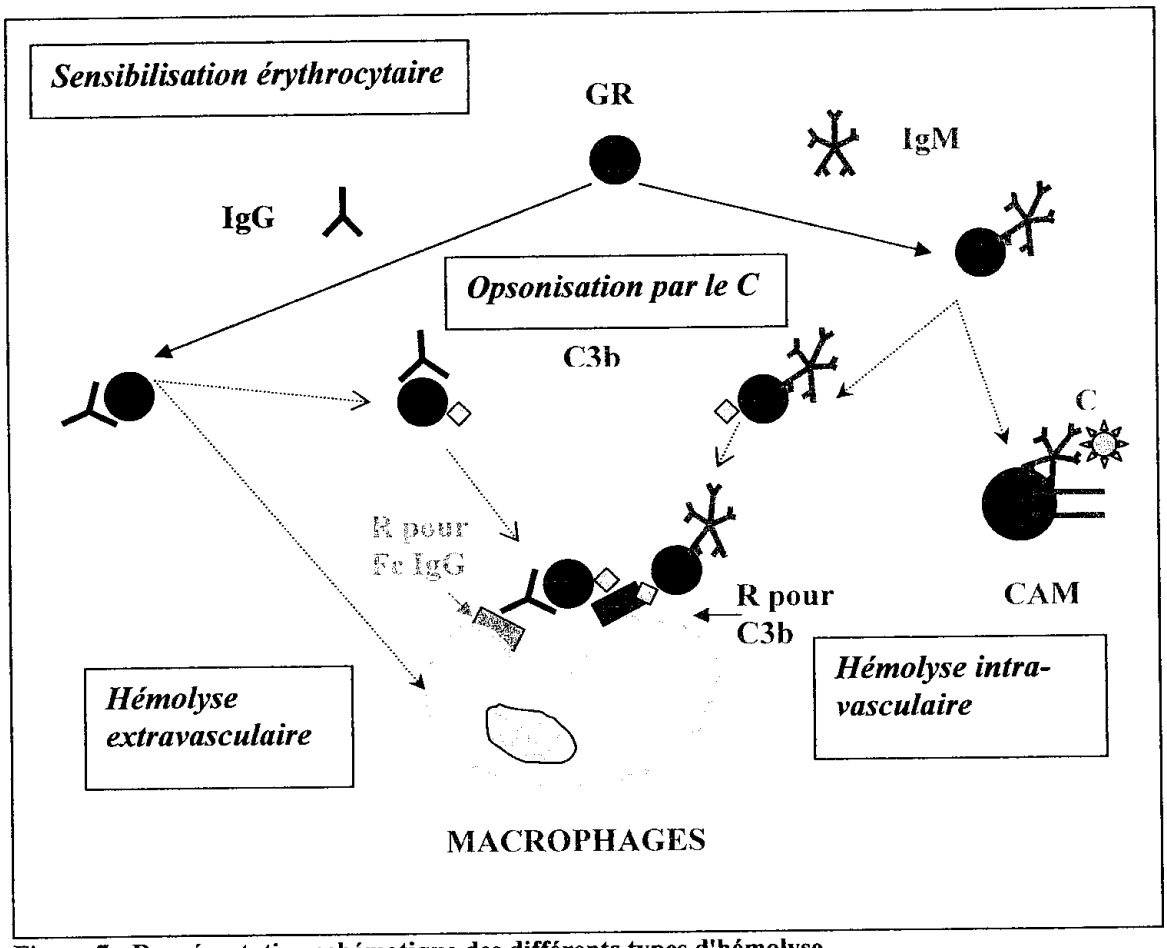


Figure 7 : Représentation schématique des différents types d'hémolyse

Remarque : une cytotoxicité directe interviendrait également bien que son rôle exact ne soit pas encore clairement défini (*Fournel 1994*). Elle mettrait en jeu des cellules K (cellules tueuses ou killer) possédant un récepteur pour le fragment Fc des IgG, ce qui leur permettrait de se fixer à la surface des hématies sensibilisées,
De même, le stress oxydatif pourrait intervenir dans certaines formes d'anémies immunologiques mais des études sont nécessaires pour définir son rôle (*Pesillo 2004*) ainsi que l'importance des marqueurs du stress oxydatif et le rôle des anti-oxydants *(McCullough 2003).*

2.Selon le comportement thermique des anticorps

2.1. Les classes à anticorps dits « chauds »

a. La classe I

Cette classe résulte d'anticorps appelés **auto-agglutinines** qui sont capables de provoquer **l'auto-agglutination** des GR comme décrit précedemment, puis il y a une phagocytose des GR agglutinés et donc hémolyse extravasculaire. Les anticorps impliqués sont des **IgG** en quantité importante ou des **IgM** qui sont plus agglutinante. Cliniquement, cette classe est identifiée par une agglutination positive sur lame (donc le test de Coombs n'est pas forcément nécessaire). L'agglutination se produit probablement aussi *in vivo* (*Halliwell 1978*).

Ces anticorps entraînent une affection sévère, aiguë voire suraiguë et à pronostic réservé (*Honeckman 1996*).

b. La classe II

Cette classe résulte d'anticorps, appelés **hémolysines**, capables de fixer le complément et donc de provoquer une **hémolyse intra-vasculaire**. Ces anticorps sont classiquement des **IgM**, mais peuvent être des **IgG**, si ces immunoglobulines se trouvent en grande quantité (*Stewart 1993a*). Le test de Coombs est nécessaire dans ce cas (*Halliwell 1978*) puisqu'il n'y a pas d'auto-agglutination identifiable.

Ces deux classes sont les deux formes les plus sévères d'AHMI et sont associées à des pronostics réservés.

c. La classe III

C'est la forme **la plus commune** d'AHMI chez le chien et elle résulte d'anticorps incomplets qui provoquent une **hémolyse extravasculaire**. Ces anticorps sont détectés seulement par le test de Coombs et c'est à ce titre qu'il trouverait sa plus grande utilité (*Stewart 1993a*). L'affection est chronique à début plutôt insidieux (*Honeckman 1996*).

2.2. Les classes à anticorps dits « froids »

Les AHMI de classes IV et V correspondent à des formes d'AHMI à Ac froids. Les Ac froids sont des Ac réagissant plus fortement à des températures basses (+ 4°C) qu'à des températures élevées. Leur pourvoir pathogène ne dépend pas de leur titre mais de leur comportement thermique. Ces anticorps sont actifs a basse température car, en général, leur site de fixation change de configuration à ces températures, ce qui explique l'augmentation de leur affinité (*Stewart 1993a*).

Les anticorps froids sont responsables de **8 à 24 %** des cas d'anémies immunologiques canines.

Dans les classes à anticorps dits « froids », les Ac pathogènes sont quasi exclusivement des **IgM**. Deux types d'Ac froids sont distingués, les agglutinines et les hémolysines froides responsables respectivement des classes IV et V.

La classe IV est due à des **agglutinines froides** (*Halliwell 1978*) qui provoquent l'agglutination des GR dans les vaisseaux de petit calibre à des températures inférieures à 37°C (agglutination spontanée sur lame à 4°C) entraînant une nécrose ischémique, alors que la classe V est due à des **hémolysines froides**, qui provoquent une hémolyse intra-vasculaire à basse température, sans qu'une agglutination survienne , le TCD à froid est nécessaire ici puisqu'il n'y a pas d'auto-agglutination identifiable (*Stewart 1993a*). La classe V entraîne des crises paroxystiques d'hémoglobinurie à froid, elle est très rare en médecine vétérinaire (*Honeckman 1996*).

Il existe un troisième groupe d'anticorps froids, rarement rencontré, les hémolysines de Donath-Landsteiner. Ces anticorps, qui sont des IgG, sont capables de se fixer aux GR si la température est inférieure à 37°C, puis de fixer le complément quand la température est supérieure (*Barker 2000*). Ainsi, le TCD est négatif à 37°C et positif à 4°C.

Enfin, notons qu'il existe des anticorps froids non pathogènes qui se fixent sur les GR seulement entre 10 et 15°C. Ils sont inoffensifs car la température dans la circulation ne descend jamais aussi bas et peuvent être retrouvés dans les sérums de nombreux animaux normaux.

Des études réalisées chez l'homme décrivent l'existence d'AHMI dites **"mixtes"** dans lesquelles on retrouve à la fois des anticorps froids et chauds, les deux types étant capables de provoquer une hémolyse. Les patients atteints de ce type d'anémie ont en général une affection sévère, qui évolue sur un mode chronique et intermittent. Cliniquement, c'est le tableau d'anémie qui prédomine et non celui des manifestations cryopathiques (*Sokol 1981, Rochant 2001*).

3.Selon l'isotype de l'anticorps

3.1.IgG

Lorsque des IgG sont présentes sur les globules rouges, avec ou sans complément (classes I et III), la maladie est le plus souvent idiopathique, aiguë et transitoire. L'évolution clinique se fait par poussées successives d'hémolyse, parfois sévères, et de rémissions. Ces formes à IgG répondent bien à la thérapeutique par les corticostéroïdes, et ne sont généralement pas secondaires à une maladie sous-jacente (*Fournel 1994*).

3.2.IgM

Lorsqu'il s'agit d'une forme à IgM (classes II, IV et V), l'affection est moins sensible au traitement par les corticostéroïdes, et le plus souvent secondaire à une affection sous-jacente. Le pronostic de ces formes à IgM ou à C3b est plus sombre que celui des formes à IgG (*Fournel 1994*).

Chez l'homme, Sokol a identifié plusieurs cas d'AHMI médiées, à la fois, par des IgG et des IgM. Ces cas présentaient une évolution chronique et intermittente avec une hémolyse sévère (*Stewart 1993a*).

3.3. Autres isotypes

Les GR sont rarement liés à des **IgA** seules (*Lewis 1989*). Une étude réalisée chez un homme atteint d'une AHMI acquise où seules des IgA sont mises en évidence montre que ces anticorps interagissent avec les monocytes sanguins et sont donc capables d'induire une hémolyse à médiation immune. Une séquestration splénique est mise en évidence et on assiste à une hémolyse extravasculaire. Aucune participation du C démontrée par cet auteur alors qu'elle l'est dans d'autres études. Même si plusieurs auteurs considèrent que les IgA jouent un rôle mineur dans les AHMI (*Lewis 1989*), d'autres leur accordent un rôle bien plus important (*Clark 1984, Day 1998b*).

Même s'il existe peu d'études spécifiques, les **IgE** et **IgD** n'ont jamais été mises en évidence dans les cas d'AHMI (*Lewis 1989*).

4.Bilan

De nombreux auteurs considèrent que les AHMI les plus fréquemment rencontrées chez le chien sont dues à l'action des **IgG**, seules ou avec le **complément** (*Fournel 1994, McCullough 2003, Halliwell 1978, Slappendel 1979, Switzer 1981*). Ainsi, dans deux études portant sur 64 chiens présentant des anémies pour lesquelles le résultat au test de Coombs était positif, la nature des anticorps (et/ou du complément) a été recherchée :

- dans 34 cas, il s'agissait d' IgG et de complément,

- dans 16 cas, d'IgG seules,
- dans 13 cas, de C seul,
- et dans 1 cas, d'IgM et de C (*Cotter 1992*).

Des constatations similaires sont faites chez l'homme. Chez ce dernier, 70 à 80 % des AHMI sont des formes à anticorps « chauds », principalement médiées par les IgG et/ou le complément. Ainsi, le complément et les IgG sont identifiés chez 50 à 80 % des enfants atteints d'AHMI en fonction des études (*Stewart 1993a*).

Cependant l'utilisation de méthodes plus sensibles que le TCD montre que les GR sont également sensibilisés par des IgM et des IgA (*Barker 1992, Jones 1987*) mais à des taux faibles le plus souvent indétectables par le TCD classique. Ainsi, la sensibilisation des GR par des Ig de différentes classes pourrait jouer un rôle dans la pathogénie (*Barker 2000, Barker 1992*).

La détermination de la classe immunologique liée à l'anémie lors d'un diagnostic d'AHMI peut donc s'avérer très utile. En effet, les aspects cliniques, la thérapeutique et le pronostic dépendent pour une grande part du type d'immunoglobuline en cause.

III. Anémie et agents pathogènes hémotropes chez le chien

A. Les agents pathogènes hémotropes du chien

1. Définition, notion d'hémopathogène et classification

1.1. Définition et présentation générale

Les **agents hémopathogènes** sont, par définition, présents dans le **tissu sanguin** (parfois même dans la lymphe). Ces hémopathogènes présentent des caractéristiques communes (*Bourdoiseau 2005a*) :

- Ce sont pour la grande majorité d'entre eux, des agents à **transmission vectorielle** (transmission par des arthropodes essentiellement). Ces maladies vectorielles sont souvent redoutables tant pour l'homme que pour l'animal. Par ailleurs, le réchauffement climatique constaté, annoncé ou envisagé peut entraîner une extension et une incidence considérables de certaines maladies (ré)-émergentes par extension géographique et modification dans la dynamique des populations de vecteurs. Enfin, la circulation et le séjour des carnivores domestiques dans les zones méditerranéennes, tropicales ou sub-tropicales renforcent le risque d'observer dans des zones tempérées des maladies jusqu'alors qualifiées d' « exotiques ».

- Ils sont à l'origine chez le chien de maladies caractérisées par :
  - l'association de syndromes pyrétique et hémolytique ;
  - l'existence de nombreuses formes atypiques ;
  - des modifications biologiques (cytopénies).

- La présence sanguine des hémopathogènes n'est pas exclusive et la localisation en d'autres tissus ou système (rate, mœlle osseuse...) est parfois démontrée ou suspectée, ce qui permet d'expliquer les phénomènes de rechutes et de comprendre les limites thérapeutiques de certains protocoles.

- Le diagnostic des affections qu'ils engendrent est le plus souvent difficile, d'autant que l'agent pathogène n'est parfois présent qu'en faible quantité et fluctuant, donc difficile à détecter avec des techniques classiques. L'utilisation de techniques de biologie moléculaire, en l'occurrence la PCR (« polymerase chain reaction »), permet de détecter des animaux souffrant de parasitémie ou de bactériémie modérées.

- Les agents pathogènes intracellulaires induisent des réactions et des phénomènes immunologiques comparables. La protection de l'animal vis-à-vis de ces agents intracellulaires repose sur une immunité à médiation cellulaire. Le plus souvent l'infection induit une immunité à médiation humorale à l'origine d'une production parfois massive d'anticorps, qui peuvent être détectés dans les 10 à 15 jours suivant l'inoculation (IgM) et qui persistent plusieurs mois (IgG). La détection des anticorps lors d'infection par des hémopathogènes n'a pas toujours de valeur diagnostique, dans la mesure où leur mise en évidence signe le contact de l'animal avec l'agent mais pas nécessairement une maladie évolutive. Seule une cinétique ou l'identification de l'isotype (IgM versus IgG) pourraient être significatives. En phase chronique, les anticorps sont produits en masse et peuvent entraîner des phénomènes immunopathologiques : vascularite, dépôts de complexes immuns, parfois apparition d'auto-anticorps.

Seuls seront étudiés ici les hémopathogènes dont l'association avec les anémies immunologiques a été démontrée ou suggérée chez le chien, c'est-à-dire :
- les bactéries : rickettsies, bartonelles et hémoplasmes ;
- les protozoaires : piroplasmes.

1.2. Les rickettsies

Les rickettsies sont de petits bacilles à Gram négatif, immobiles, intracellulaires obligatoires, parasites des cellules sanguines ou dérivées (macrophages) ou des cellules endothéliales, à transmission vectorielle.
On en distingue deux types principaux :
- Les rickettsies de la famille des *Rickettsiaceae*, responsables de rickettsioses, au sens strict.
- Les rickettsies de la famille des *Anaplasmataceae*, responsables des erhlichioses.

a. Famille des Rickettsiaceae

Les rickettsioses, au sens strict, sont des infections vectorielles causées par des bactéries intracellulaires appartenant au genre *Rickettsia*, de la famille des *Rickettsiaceae*, de l'ordre des Rickettsiales. Ces bactéries transmises par des arthropodes (puces, tiques, poux) peuvent infecter l'homme et les animaux.

Les organismes du genre *Rickettsia* sont classiquement divisés en 2 groupes :
- le groupe des « fièvres boutonneuses » dont les agents sont transmis par les tiques. *Rickettsia rickettsii*, l'agent de la fièvre pourpre des Montagnes rocheuses, peut infecter l'homme et le chien. Cet agent envahit les cellules endothéliales. Il se rencontre uniquement en Amérique du Nord. Il existe d'autres espèces du même genre capables d'infecter le chien, mais leur pathogénicité est encore très peu ou mal connue.
- le groupe du « typhus » dont les agents sont transmis par les puces et les poux et sont responsables principalement de maladies humaines.

b. Famille des Anaplasmataceae

Les *Ehrlichia sensu lato* sont de petits bacilles à Gram négatif, immobiles, intracellulaires obligatoires, parasites des cellules sanguines ou dérivées (macrophages), à transmission vectorielle.
Les *Ehrlichia* parasitent les monocytes, les granulocytes et les plaquettes (*Bexfield 2005, Skotarczak 2003*).

Les outils de la biologie moléculaire, notamment, l'étude de l'ARN ribosomal (ARNr) 16S, ont bouleversé la classification des bactéries de l'ordre des Rickettsiales auquel elles appartiennent. Désormais, ces agents sont regroupés au sein de la famille des *Anaplasmataceae*, laquelle comprend 3 groupes principaux (*Breitschwerdt 2005b, Goldman 1998, Skotarczak 2003*).
Chacun de ces groupes comporte des agents susceptibles d'infecter le chien *(tableau 5).*

Les caractéristiques épidémiologiques de ces maladies sont étroitement dépendantes de leurs vecteurs. Hormis le groupe 3, ces agents infectieux sont transmis par des arthropodes :

- les agents du groupe 2 seraient surtout transmis par des tiques du genre *Ixodes* (*I. ricinus* en France) ;
- les agents du groupe 1 seraient surtout transmis par des tiques dures autres qu'*Ixodes*.

Ainsi, l'ehrlichiose monocytaire canine (*Ehrlichia canis*) est ubiquitaire en dessous du 45ième parallèle, dans la zone de distribution de la tique brune du chien, *Rhipicephalus sanguineus*.
Toutefois, beaucoup d'observations montrent que les vecteurs sont assez variables d'un pays à l'autre. Cette adaptabilité à différents vecteurs expliquerait pour partie leur émergence dans de nombreux pays (*Chabanne 2005*).
Une saisonnalité liée à la transmission vectorielle est décrite.

En **France**, on trouverait principalement ***Ehrlichia canis***, ***Anaplasma platys*** et ***Anaplasma phagocytophilum*** (*Beaufils 2002*).

Espèce	Répartition	Principaux vecteurs identifiés	Hôte autre que le chien	Maladie chez le chien	Cellules cibles chez le chien
***Ehrlichia* (groupe 1)**					
E. canis (ex. *Rickettsia canis*)	Mondiale	*Rhipicephalus sanguineus*	Canidés sauvages	Ehrlichiose monocytaire canine (pancytopénie tropicale canine)	Cellules mononucléées
E. chaffeensis	Etats-Unis	-*Amblyomma americanum* -*Dermacentor variabilis*	Homme	?	Cellules mononucléées
	Asie	-*Amblyomma testudinarium* -*Haemaphysalis sp.*			
E. ewingii	Etats-Unis	-*Amblyomma americanum* -*Otobius megnini* -*Ixodes ?*	Homme	Ehrlichiose granulocytaire canine	Granulocytes
***Anaplasma* (groupe 2)**					
A. platys (ex. *Ehrlichia platys*)	Mondiale	*Rhipicephalus sanguineus*		Thrombopénie cyclique	Thrombocytes
A. phagocytophilum (ex. *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, *Agent de l'ehrlichiose granulocytaire humaine*)	Mondiale	-*Ixodes ricinus* (Europe) -*Ixodes scapularis* (Etats-Unis) -*Ixodes pacificus* (Californie)	-Cheval -Ruminant -Homme -Chat	-Ehrlichiose granulocytaire équine -Ehrlichiose granulocytaire humaine -Fièvre à tiques des Ruminants -ehrlichiose granulocytaire canine	Granulocytes
***Neorickettsia* (groupe 3)**					
N. risticii (ex *Ehrlichia risticii*)	Amérique du Nord	Larves de trématodes	Cheval	-Fièvre du Potomac -Ehrlichiose monocytaire canine atypique	Cellules mononucléées
N. helminthoeca		*Nanophyts salmoncola*	Canidés sauvages	« Salmon poisoning »	Cellules mononucléées

Tableau 5 : Les principales ehrlichioses canines d'après (*Chabanne 2005*)
Remarque : Les *Ehrlichia* présentes en France apparaissent en grisé dans le tableau

1.3. Les bartonelles

Les bartonelles sont des bactéries Gram négatif, intra érythrocytaires, à transmission vectorielle, qui induisent fréquemment des infections persistantes. Le chat (*B. henselae*), les bovins (*B. bovis*), l'homme (*B. quintana*) et les rongeurs sont des hôtes naturels. Ces bactéries peuvent être transmises accidentellement à des hôtes non réservoirs, soit par leur vecteur (puces, poux et tiques), soit par griffure ou morsure. C'est ainsi qu'elles peuvent être transmises au chien (*Breitschwerdt 2005a*). L'infection par ce genre bactérien fait donc classiquement intervenir : un réservoir principal, un vecteur arthropode hématophage qui assure la pérennité de l'infection dans l'espèce réservoir et un hôte accidentel qui présente des symptômes (*Boulouis 2005*).

Bartonella vinsonii est considérée comme l'espèce de bartonelles la plus fréquemment impliquée dans les affections du chien, mais d'autres espèces existent et ont été isolées chez des chiens, en particulier *B. henselae* (ou *B. clarridgeae*, *B. elizabethae*)(*Breitschwerdt 2005a*) et pourraient être responsables de signes cliniques chez ce dernier (*Goodman 2005*).

De nombreux chiens infectés par *Ehrlichia canis* et *Babesia canis* sont aussi infectés par *Bartonelle vinsonii. Or E. canis et B. canis* sont toutes les deux transmises par la tique *Rhipicephalus sanguineus*, donc cette tique pourrait également être impliquée dans la transmission de *Bartonella vinsonii* (*Breitschwerdt 2005a*). Mais d'après d'autres études, une transmission par des tiques du genre *Ixodes* serait également possible (*Breitschwerdt 2004*).

1.4. Les hémoplasmes

Les hémoplasmes appartenaient jusqu'à maintenant à l'ordre des Rickettsiales (famille des Anaplasmataceae) mais cela a récemment été remis en question et ils sons désormais rattachés aux mycoplasmes, c'est pourquoi ils ont été rebaptisés « hémoplasmes » et non plus hémobartonelles.
Contrairement aux chats, les chiens sont rarement atteints d'hémobartonellose. Chez eux, l'agent en cause est *Mycoplasma haemocanis* (*ex Haemobartonella canis*) qui est transmis par une morsure de tique ou du sang infecté. Les hémoplasmes sont des parasites de l'hématie attachés à la surface externe de la cellule, ce sont des bactéries à Gram négatif, qui peuvent être observées au microscope optique sur frottis sanguin coloré au May-Grünwald-Giemsa sous la forme de chaînes qui s'étendent à la surface des GR infectés. L'organisme adhère mais ne pénètre pas dans le GR, donc l'anémie ne résulte pas de dommages directs des GR mais d'autres mécanismes, potentiellement à médiation immune (*Jain 1993*).

1.5. Les piroplasmes

La piroplasmose ou babésiose est due à la **multiplication intra-érythrocytaire** de **protozoaires** du genre *Babesia*, transmis par l'intermédiaire de tiques dures.

En **France**, sont observées ***Babesia canis canis*** et ***Babesia canis vogeli***, respectivement transmises par les tiques *Dermacentor reticulatus* et *Rhipicephalus sanguineus* (*Bourdoiseau 2005c*).

Le chien est infecté par deux types de babésies : *Babesia canis* est plus grosse et piriforme, *Babesia gibsoni* est classiquement plus petite et apparaît sphérique, en anneau, ovale, allongée, amiboïde ou en forme de baguette, mais rarement piriforme (*Jain 1993*).

Type de babésie	dimensions	dénomination	répartition	Tique vectrice	Pouvoir pathogène
« grande » (B.canis)	2x5 µm	*B. c. canis*	Europe	*Dermacentor*	Modéré à sévère
		B. c. vogeli	Europe	*Rhipicephalus*	Faible à modéré
		B. c. rossi	Afrique du Sud	*Haemaphysalis*	sévère
« petite »	1x3 µm	*B. gibsoni*	Europe du Sud	*-Haemaphysalis* *-Rhipicephalus ?*	Modéré à sévère
		Souche californienne	Californie	?	
		Souche espagnole	Nord de l'Espagne		

Tableau 6 : Agents responsables des babésioses du chien d'après (*Bourdoiseau 2005c*)

2. Expression clinique

2.1. Ehrlichiose monocytaire canine à Ehrlichia canis

Trois phases sont classiquement décrites chez les chiens infectés expérimentalement, mais elles ne sont pas faciles à distinguer chez les chiens naturellement infectés, en particulier parce que la date de l'infection ehrlichienne est inconnue (*Mylonakis 2004b, Neer 2002, Skotarczak 2003*).

Après l'inoculation d'*Ehrlichia canis*, il y a une période d'incubation de 8 à 20 jours précédant le début de la ***phase aiguë***. Cette phase, qui dure entre 2 et 4 semaines, inclue une **hyperthermie** d'apparition brutale (jusqu'à 41°C en plateau), une **anorexie**, un **amaigrissement**, une **pâleur des muqueuses**, une **léthargie**, une **asthénie**, une **lymphadénopathie**, une **splénomégalie**, des **signes digestifs** (vomissements, diarrhée parfois hémorragique) (*Goldman 1998*) et des **signes respiratoires** (dyspnée, toux, halètement, jetage nasal). Des **atteintes du système nerveux central** (hyperesthésie, contracture, voire convulsions, ataxie, déficits vestibulaires et dysfonctionnements cérébelleux) (*Bexfield 2005*) peuvent également être observés suite à l'inflammation ou à un saignement méningé, et sont plus communs au cours de la phase aiguë. La durée et l'expression clinique de la phase aiguë sont parfois très limitées (simple hyperthermie avec anorexie et abattement passager) (*Chabanne 2005*).

Une **thrombopénie** et/ou une **leucopénie** sont généralement présentes dans les 10 à 20 premiers jours qui suivent l'infection expérimentale, une **anémie** (*Davoust 1993, Frank 1999*) et une **hypergammaglobulinémie** peuvent également être mises en évidence mais de façon moins systématique (*Skotarczak 2003*). Les **signes hémorragiques** (pétéchies, purpura, épistaxis) sont généralement observés plus tardivement au cours de l'évolution de l'affection.

La ***phase subclinique*** suit la résolution des signes aigus et dure en général de 40 à 120 jours, bien qu'elle puisse durer des années. Pendant cette phase le chien apparaît cliniquement en bonne santé, une thrombopénie modérée, une légère leucopénie et une hypergammaglobulinémie peuvent être observées. Si une réponse immunitaire adaptée empêche la multiplication de la bactérie, l'infection est stabilisée. La bactérie peut toutefois persister dans des macrophages (notamment au niveau splénique) toute la vie du chien, on parle alors d' « **ehrlichiose chronique asymptomatique** » (majorité des cas) (*Skotarczak 2003*). Cependant, il a aussi été montré récemment que des cas de **guérison** sont possibles, certains chiens éliminant spontanément la bactérie pendant la phase subclinique. En cas d'affaiblissement des défenses de l'organisme, notamment de stress et de maladies

intercurrentes, le chien infecté peut présenter de nouveau un tableau clinique d'ehrlichiose semblable à celui de la phase aiguë qui peut survenir jusqu'à plusieurs années après la piqûre initiale de la tique (*Davoust 1993*). L'infection peut alors être particulièrement grave quand des désordres immunologiques s'installent et provoquent des hémorragies mortelles (*Mylonakis 2004b*).

Pendant la ***phase chronique***, l'ehrlichiose se manifeste sous la forme d'affections inflammatoires pléiomorphes, multisystémiques. La sévérité des signes cliniques est variable. Un **amaigrissement**, des **oedèmes** au niveau des membres et du scrotum et des modifications hématologiques, incluant une **pancytopénie** sont fréquemment observés, une thrombopénie isolée peut également être présente. Des troubles **hémorragiques** notamment des ecchymoses, des pétéchies et une épistaxis sont fréquemment rapportés (*Mylonakis 2004b*). Des **manifestations oculaires**, avec une chassie purulente, une uvéite antérieure, un hyphéma, une opacification de la cornée, une conjonctivite et une atteinte rétinienne (hémorragie notamment) peuvent survenir et conduire progressivement à la cécité. Des **signes rénaux** (syndrome néphrotique associé à une glomérulonéphrite) sont également décrits (*Chabanne 2005*). La mort survient en général suite à des hémorragies généralisées ou des surinfections bactériennes secondaires (*Davoust 2001, Kuehn 1985, Mylonakis 2004b*).

2.2. Autres « ehrlichioses » canines

a. Ehrlichiose monocytaire canine à Ehrlichia chaffeensis

Les chiens infectés expérimentalement avec *E. chaffeensis* ont en général des signes modérés limités à une hyperthermie, la thrombopénie n'est pas observée.

b. Ehrlichiose granulocytaire canine à Anaplasma phagocytophilum

E. ewingii et *A. phagocytophilum* sont tous les deux responsables d'une ehrlichiose granulocytaire canine et produisent des signes cliniques similaires peu spécifiques, incluant de façon très inconstante **hyperthermie, léthargie, anorexie, amaigrissement, vomissements** et **diarrhée, troubles hémorragiques** (pétéchies, saignements gingivaux), spléno-hépatomégalie et adénomégalie et rarement une ataxie. Une **polyarthrite** est fréquemment présente (*Goldman 1998*). Dans quelques cas, l'affection demeure cependant asymptomatique (*Goldman 1998*).

Les **signes biologiques** regroupent :
- au début de l'affection : une thrombopénie sévère, une leucopénie avec lymphopénie, éosinopénie et neutropénie et une **anémie** normocytaire normochrome arégénérative modérée. Ces signes coïncident avec l'apparition des inclusions d'*ehrlichia* dans les neutrophiles

- après quelques jours, on observe une normalisation des paramètres hématologiques : la thrombopénie est modérée, la leucopénie est compensée et on observe une leucocytose, l'anémie est plus longue à se normaliser (*Lilliehoulm 1998, Bexfield 2005, Kirtz 2005*).

Ainsi, certains auteurs insistent sur le fait qu'il est important d'inclure l'ehrlichiose granulocytaire canine dans le diagnostic différentiel des deux syndromes suivants : une **anémie chronique** modérée à sévère et une polyarthrite (*Goldman 1998, Skotarczak 2003*).

c. Thrombopénie cyclique à Anaplasma platys

Selon les auteurs et les zones géographiques, l'infection par *Anaplasma platys* peut être asymptomatique ou des signes cliniques de nature variée peuvent être présents. Selon les publications, les chiens infectés peuvent présenter un léger syndrome fébrile ou une

hyperthermie, un abattement, une anorexie, une uvéite ou des troubles digestifs. La principale anomalie biologique est une **thrombopénie cyclique**, parfois très marquée. On observe aussi de façon plus inconstante une **anémie** normocytaire normochrome non régénérative et une leucopénie avec neutropénie, éosinopénie et lymphopénie. Selon les auteurs, les signes hémorragiques liés à la thrombopénie sont discrets à marqués (*Beaufils 2004*).

2.3. *Fièvre pourprée des montagnes rocheuses* (*Rickettsia rickettsii)*

Les chiens infectés par *Rickettsia rickettsii* présentent rapidement une affection sévère et les signes cliniques sont presque similaires à ceux rencontré lors de la phase aiguë de l'ehrlichiose monocytaire canine. La **fièvre** survient 4 à 5 jours après la morsure de tique, des **pétéchies** et des **ecchymoses** apparaissent sur les muqueuses suite à la **thrombopénie** et les signes progressent vers des saignements et éventuellement une atteinte organique systémique. Les signes rapportés incluent également : une **anorexie**, de l'**apathie**, des **vomissements**, de la **diarrhée**, un **amaigrissement**, une **adénomégalie**, une **myalgie**, une **arthralgie**, une **atteinte oculaire** (atteintes sclérale et rétinienne) et des **signes neurologiques** (hyperesthésie, ataxie, tétraparésie, signes vestibulaires) (*Gasser 2001*).

Une leucopénie peut survenir au début de l'affection avec des granulations toxiques dans les neutrophiles (*Gasser 2001*), cela peut ensuite évoluer vers une leucocytose. Une anémie normocytaire normochrome plus ou moins sévère peut également être présente, de même qu'une hypoalbuminémie. Malgré de grandes similitudes avec l'ehrlichiose monocytaire canine, la fièvre pourpre des montagnes rocheuses présente quelques particularités : l'affection est plus courte, en général deux semaines, survient de façon plus brutale, avec une incidence saisonnière durant les mois chauds (mars à octobre) et ne présente pas de phase chronique (*Breitschwerdt 2005b*).

2.4. *Infections à Bartonella spp.*

Les bartonelles sont responsables d'angiomatose bacillaire, de péliose hépatique, de fièvre d'origine indéterminée, d'endocardite, de myocardite, d'hépatite granulomateuse, de lymphadénite granulomateuse, de lésions dermatologiques (vascularite cutanée), d'uvéite antérieure, de polyarthrite neutrophilique, de méningoencéphalite neutrophilique ou granulomateuse, et d'**AHMI** (*Breitschwerdt 2005a*).

2.5. Infection à Mycoplasma haemocanis

Les hémoplasmes peuvent être présentes chez des chiens cliniquement sains mais peuvent devenir pathogènes dans certaines conditions : si un chien porteur subit une splénectomie dans un but thérapeutique, si un chien porteur développe une autre affection (infection bactérienne ou parasitaire, lymphome) ou si un chien ayant subi une splénectomie est transfusé avec le sang d'un chien porteur. Une anémie, potentiellement à médiation immune, est alors observée (*Jain 1993*).

2.6. Piroplasmose

- Forme classique

La forme classique aiguë se caractérise par un **abattement marqué** et **brutal**, une **anorexie**, une **fièvre** d'apparition brutale, élevée (40°C au minimum) en plateau d'au moins 48 heures associée à une polypnée et une tachycardie. Un **syndrome hémolytique** est présent et se caractérise par des muqueuses pâles, parfois subictériques. Les signes biologiques

incluent une anémie hémolytique régénérative, une thrombopénie et une leucopénie de façon plus inconstante. Une bilirubinurie (urines « marc de café ») est fréquemment observée, une hémoglobinurie peut aussi être présente. Des **insuffisances hépatique ou rénale** peuvent se développer secondairement. L'évolution se fait en général vers des complications même si parfois la guérison est spontanée. La mort est possible par choc et/ou par insuffisance rénale aiguë. Des rechutes sont possibles après traitement avec le même tableau clinique 8 à 10 jours plus tard, parfois elles sont répétées et pourraient être imputables à un mécanisme d'échappement au système immunitaire. Dans la forme classique, les principales manifestations sont en général liées à l'hémolyse.
Des porteurs asymptomatiques existent.

- Formes atypiques et/ou complications de la forme aiguë
  Les formes atypiques et/ou les complications de la forme aiguë se manifestent par :
  - des **formes locomotrices** : démarche ébrieuse, lombalgie, arthralgies, parésie, paralysie, ataxie ;
  - des **formes cérébrales et oculaires** : convulsions, nystagmus, anisocorie, modifications comportementales, coma, parfois suivis de guérisons complètes sans séquelles ;
  - des **formes digestives et respiratoires** ;
  - des **atteintes rénales** : oligurie, anurie, hémoglobinurie avec un syndrome d'insuffisance rénale ;
  - des **formes vasculaires, cutanées et muqueuses** : oedèmes (notamment pulmonaire), coagulation intra vasculaire disséminée, hémorragies diffuses, purpura, rhabdomyolyse, stomatite, ulcères cutanées et nécrose des extrémités ;
  - une **anémie** persistante et importante.

Dans ces formes atypiques ou compliquées, les manifestations ne sont pas toutes imputées à l'hémolyse. Celles-ci s'apparentent à un syndrome pseudo-systémique avec une inflammation générale et une défaillance multiviscérale (neurobabésiose, hypotension, hypoglycémie, troubles de l'équilibre acido-basique, pancréatite aigue...) (*Bourdoiseau 2005c*).

2.7. Cas des co-infections

Les co-infections par différents hémopathogènes sont fréquemment rapportées dans la littérature.

En particulier, la tique *Rhipicephalus sanguineus*, présente en France est responsable de la transmission de *Ehrlichia canis, Babesia canis, Hepatozoon canis* (par ingestion), *Mycoplasma haemocanis* et *Anaplasma platys*, des co-infections par ces différents agents sont donc possibles (*Davoust 2001, Kuehn 1985*). Cela pose en général un véritable dilemme diagnostique car les signes cliniques et biologiques rencontrés sont alors peu spécifiques (*Mylonakis 2004a*).

Les chiens semblent souvent co-infectés par *Ehrlichia canis* et *Babesia canis*, comme le montre une étude réalisée chez 105 chiens en Afrique du sud. Dix-sept pour cents des chiens ont une co-infection par ces deux hémopathogènes, deux tiers des chiens porteurs de *B. canis* sont aussi infectés par *E. canis* et un tiers des chiens avec *E. canis* par *B. canis*. L'anémie est plutôt régénérative lors de babésiose et arégénérative lors d'ehrlichiose. Il n'existent pas de signes cliniques ou biologiques pathognomoniques de l'une ou l'autre, ce qui ne permet pas de les différencier sans avoir recours à des examens complémentaires (*Matthewman 1993*).

En général, les patients avec deux affections concomittantes sont sérieusement atteints et les signes biologiques, notamment l'anémie, sont plus marqués (*Jain 1993*).

B. Pathogénie de l'anémie

1. Rickettsioses

Toutes les études s'accordent à dire qu'une **anémie** est fréquemment présente lors d'ehrlichiose *(Neer 2002, Davoust 1993)*.

Selon les différentes études, le pourcentage de **chiens infectés** par des *Ehrlichia* et qui sont **anémiés** varie énormément : de **25%** *(Beaufils 2006)* lors d'infections par *Anaplasma platys* à **43%** *(Frank 1999)* ou **71%** lors d'ehrlichiose à *Ehrlichia canis (Kuehn 1985)*, voire même **100%** lors de certaines infections chroniques *(Mylonakis 2004b)*. La sévérité de l'anémie est également très variable : de modérée à sévère.

Cette anémie est souvent **arégénérative**, bien que des formes **régénératives** puissent être occasionnellement observées *(Gould 2000, Suto 2001)*. Ainsi, l'anémie serait arégénérative chez **81%** *(Frank 1999)*, **85%** *(Kuehn 1985)*, voire **94 %** des chiens (*Mylonakis 2004b*).

Ces études diffèrent quant à l'origine possible de cette anémie.

1. Pour certains auteurs, les anémies engendrées par les infections ehrlichiennes seraient **centrales** et résulteraient des effets suppressifs de la bactérie sur la moelle osseuse *(Bexfield 2005)*.

2. Cependant, chez certains chiens infectés par des *ehrlichiae au sens large* et présentant une anémie, des signes en faveur d'une **AHMI** (sphérocytose, auto-agglutination, test de Coombs direct positif) sont présents *(Gaunt 2000)*.

Toutefois, tous les auteurs ne sont pas d'accord pour reconnaître l'origine immunologique de l'anémie lors d'ehrlichiose.

- Ainsi, pour certains auteurs, les ehrlichioses ne semblent pas favoriser les AHMI, et plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer la positivité du test de Coombs rencontrée dans certains cas d'ehrlichiose :

  - Il est possible que les chiens aient été antérieurement infectés par une *Ehrlichia* et qu'une recrudescence de l'infection soit observée à cause d'une affection à médiation immune concomitante, notamment une AHMI *(Bexfield 2005)*. Ainsi, les affections qui compromettent le système immunitaire pourraient rendre l'animal plus susceptible de développer les manifestations chroniques de l'infection ehrlichienne *(Frank 1999)*.

  - Les deux affections peuvent être concomitantes sans lien de cause à effet. L'animal peut être séropositif pour une ehrlichiose (découverte fortuite), sans que les signes cliniques qu'il présente ne soient reliés à cette infection *(Bexfield 2005)*.

- Il pourrait y avoir une absorption passive sur les globules rouges des globulines suite à l'hypergammaglobulinémie engendrée par l'infection ehrlichienne et donc cela positiverait le test de Coombs direct *(Kuehn 1985)*.

- Une autre affection concomitante pourrait également positiver le test de Coombs direct (TCD). Par exemple, dans une étude portant sur 62 chiens infectés par *Ehrlichia canis*, le TCD est positif chez deux chiens mais un carcinome hépatique et une phaeohyphomycose disséminée concomitants ont été diagnostiqués chez ces deux chiens, ce qui peut avoir influencé le test (*Frank 1999*).

- D'autres auteurs, au contraire, qualifient les anémies rencontrées lors d'ehrlichiose d'immunologiques.

Ainsi, plusieurs cas d'AHMI associés aux différentes espèces d'*Ehrlichia* ont été décrits dans la littérature ces dernières années :
- lors d'ehrlichiose granulocytaire canine *(Bexfield 2005, Goldman 1998)*
- lors d'ehrlichiose monocytaire canine *(Frank 1999, Mylonakis 2004b)*

Chez l'homme, des cas d'AHMI sont occasionnellement rapportés en association avec l'ehrlichiose monocytaire humaine.

La positivité du test de Coombs s'expliquerait donc par une véritable réponse immune due notamment à l'**adhérence des auto-anticorps** sur la membrane des GR ou à une **réactivité croisée** entre les *Ehrlichia* sens large et les antigènes érythrocytaires *(Frank 1999, Kuehn 1985)*. En effet, lors de la phase chronique, l'ehrlichiose présente les caractéristiques d'une maladie auto-immune. On peut déceler des anticorps anti-nucléaires et anti-plaquettes et des cas de glomérulonéphrites sont décrits *(Davoust 1993)*.

Une **immunodépression** et/ou une **dysrégulation du système immunitaire** pourraient également être impliquées dans la survenue des AHMI lors d'ehrlichiose. En effet, de nombreuses études font état d'une immunosuppression induite par les *Ehrlichia* sens large, ce qui pourrait être responsable du développement d'autres affections, notamment les AHMI *(Shaw 2005, Kirtz 2005)*.

Par ailleurs, une dysrégulation du système immunitaire, mise en évidence par l'inversion du ratio CD4/CD8 via une analyse en cytométrie de flux survient chez certains chiens infectés par des *Ehrlichia*. Le mécanisme responsable de cette dysrégulation n'est pas connu précisément. Cette découverte suggère que cette dysrégulation immune pourrait prédisposer les chiens infectés par des *Ehrlichia* à d'autres processus pathologiques, notamment les AHMI *(Frank 1999)*.

Dans une étude portant sur 101 cas d'ehrlichiose monocytaire canine, les bergers allemands sont sur-représentés. Cette différence de sensibilité raciale à l'affection pourrait être due à une différence dans la réponse immune à médiation cellulaire ou humorale. Certaines études ont, en effet, montré que la réaction immune à médiation cellulaire contre *E. canis* était plus faible chez le berger allemand que chez le beagle, mais dans la même étude il n'y avait pas de différence entre les réponses à médiation humorale. Ceci suggère que la réponse à médiation cellulaire pourrait jouer un rôle important dans la protection contre *E. canis (Davoust 2001, Harrus 1997)*. En effet, elle est déprimée chez les bergers allemands infectés par *E. canis (Frank 1999)*. Cette altération de la réponse à médiation cellulaire pourrait jouer un rôle dans la survenue des ehrlichioses mais également dans celle d'autres affections associées, notamment les AHMI.

Le rôle des ehrlichioses chroniques dans le développement d'affections

concomitantes demeurent flou, des études supplémentaires seraient donc nécessaires *(Frank 1999)*.

3. D'autres auteurs qualifient l'anémie observée lors d'ehrclihiose d'**inflammatoire** en se basant sur les caractéristiques de l'anémie, la concentration sérique en fer, la capacité de fixation totale du fer et la lecture du myélogramme *(Lilliehoulm 1998, Beaufils J.P. 2004)*. Ceci apparaît controversé dans certaines études puisque l'hypoplasie érythroïde et les quantités augmentées de fer médullaire, signes typiques d'une anémie associée à une atteinte inflammatoire ne sont pas retrouvés sur la majorité des myélogrammes observés issus de chiens atteints d'ehrlichiose.

4. Enfin, certains auteurs suggèrent que cette anémie pourrait résulter d'une **carence en fer** due à des pertes chroniques provoquées par l'infection ehrlichienne *(Kuehn 1985)*.

En conclusion, on ne sait pas si les ehrlichioses sont responsables au sens strict de AHMI ou si elles entraînent des modifications au niveau de l'organisme, notamment des perturbations du système immunitaire, qui prédisposeraient aux AHMI, mais d'après les différentes études parues ces dernières années, l'association entre AHMI et ehrlichiose est bien décrite, et il parait intéressant de la rechercher. Par ailleurs, même si une anémie à composante centrale et/ou inflammatoire existe, les études montrent que, dans plusieurs cas, un mécanisme immunologique est bien présent (sphérocytose, auto agglutination, TCD positif) lors d'ehrlchiose. Ainsi, plusieurs mécanismes pathogéniques pourraient être responsables de l'anémie, et varier en fonction des cas.

2. Infection à *Bartonella spp.*

Plusieurs études font état d'anémie chez des chiens infectés par des bartonelles. Ces anémies sont principalement régénératives, et le test de Coombs peut être positif. Par exemple, dans une étude portant sur 24 cas d'infection par *B. vinsonii sub-espèce berkhoffii*, 8 chiens sont anémiés (33%), et le TCD est positif chez 3 des 4 chiens testés. Des cas d'AHMI sont également rapportés chez des chiens infectés par *Bartonella henselae*, mais aucune étude statistique n'a été réalisée pour confirmer l'association (*Goodman 2005*).

L'infection de l'homme par *Bartonella bacilliformis* en Afrique du sud peut entraîner une anémie hémolytique fatale.

La cause de l'AHMI chez le chien n'est pas encore établie, mais au moins 21% des chiens infectés par des bartonelles présentent des signes cliniques ou biologiques compatibles avec une AHMI.

Certains auteurs conseillent donc de rechercher cette bactérie lors d'AHMI (*Breitschwerdt 2004, Goodman 2005*).

3. Piroplasmose

Le piroplasme se divise par scission binaire ou par un processus de bourgeonnement au sein des érythrocytes et détruit par conséquent les GR dans la circulation sanguine lors de sa sortie des cellules. L'**anémie** est en général **régénérative** et **macrocytaire hypochrome** (*Jain 1993*). En fonction des publications, l'hémolyse serait principalement intra vasculaire (*Gaunt 2000*) ou extravasculaire (*Giger 2005*).

Toutefois, l'anémie rencontrée lors de piroplasmose, ne peut être attribuée uniquement à l'hémolyse liée à la position intra érythrocytaire du protozoaire. En effet, le degré de l'anémie n'est généralement pas proportionnel au degré de parasitémie puisque seulement 0,1

% des hématies sont parasitées, ce qui suppose que d'autres mécanismes impliquant les GR non parasités interviennent (*Bourdoiseau 2005b*).

Deux mécanismes principaux seraient impliqués : un stress oxydatif et une AHMI secondaire voire une véritable AHAI. Une auto-agglutination, une augmentation de la fragilité osmotique des GR, la présence de sphérocytes sur le frottis sanguin et un résultat positif au test de Coombs sont, en effet, fréquemment rencontrés lors d'anémie associée à une piroplasmose, ce qui est fortement en faveur d'un **mécanisme immunologique** (*Giger 2005, Jain 1993, Gaunt 2000*).

Par ailleurs, dans une étude portant sur 35 chiens atteints d'AHMI, neuf d'entre eux, soit 25,7% ont présenté un épisode de piroplasmose dans le mois précédant la survenue de l'AHAI. Dans deux cas, outre les signes pré-cités, le caractère auto-immun a été démontré avec certitude par la technique d'élution suivie d'un test de Coombs indirect (*Person 1988*). Il semble donc que les piroplasmes puissent être responsables d'anémies hémolytiques à médiation immune, sans auto-anticorps *sensu stricto*, ou qu'ils puissent secondairement induire une véritable AHAI (*Fournel 1994*).

Les anticorps, principalement des IgM et des IgG, seraient produits contre :
- les épitopes des agents infectieux,
- les épitopes des membranes érythrocytaires qui sont exposés après l'infection ou la lyse des cellules (*Gaunt 2000*). En effet, des anticorps pourraient se former suite à une altération des antigènes de la surface membranaire érythrocytaire par le parasite (*Jain 1993*).

Enfin, une inhibition de l'érythropoïèse pourrait également être impliquée (*Jain 1993*).

Chapitre II : Etude clinique

I. Critères épidémiologiques

De nombreux facteurs prédisposant aux AHMI sont définis chez le chien. Ces facteurs sont, pour la plupart, similaires pour les formes périphériques et centrales.

A. Age

Bien que les AHMI puissent survenir à tout âge, les chiens atteints d'AHMI sont majoritairement des **chiens jeunes** ou **d'âge moyen** (*McCullough 2003, Thébault 2005, Fournel 1994, Day 2000, Miller 2003, Cotter 1992*). Les chiens qui ont entre 2 et 4 ans, et 5 et 7 ans ont plus de risque de développer l'affection que les chiens de moins de 2 ans (*Reimer 1999*). Ceci concerne particulièrement les AHMI primaires puisque les AHMI secondaires dépendent principalement des caractéristiques épidémiologiques de l'affection sous-jacente (*Stewart 1993b*).

Chez l'homme, les AHMI affectent en général les jeunes adultes, plus rarement les enfants et les nouveaux-nés. On note également une augmentation de l'incidence après la ménopause chez la femme (*Dodds 1977*). Selon d'autres auteurs, l'incidence des AHMI augmenterait de façon marquée après 41 à 50 ans, comme en atteste l'étude de Sokol sur 865 cas (*Stewart 1993a*).

Au contraire, la fréquence des autres phénomènes auto-immuns, chez l'homme et les animaux, augmente souvent avec l'âge (*Barker 2000*).

B. Sexe et statut sexuel

Chez l'homme, les **femmes** représenteraient environ **60%** des cas d'AHMI (*Rochant 2001*), sauf chez l'enfant où une prédominance masculine est notée (*Habibi 1974*). Ceci pourrait refléter une prédisposition génétique chez les enfants, alors que chez les adultes, il s'agirait plutôt de cas acquis ou du résultat à long terme d'une influence environnementale (*Miller 2004*). En particulier, cette augmentation de l'incidence des AHMI chez les femmes pourrait être liée à une plus forte incidence de **lupus érythémateux systémique** (LES) et d'AHMI concomitante associée. Les femmes étant prédisposées au LES, la distribution sexuelle serait influencée par cette affection sous-jacente (*Jacobs 1984*).

Chez le chien, l'existence d'une prédisposition sexuelle lors d'AHMI ne fait pas l'objet d'un consensus actuellement.

Pour certains auteurs, les chiens atteints d'une AHMI primaire sont classiquement des **femelles** (*Thébault 2005, Lewis 1989, Stewart 1993b, Cotter 1992*).

Une hypothèse avancée pour expliquer cette prédisposition sexuelle serait qu'un taux élevé d'**oestrogènes** favorise le développement des affections auto-immunes (*McCullough 2003, Stewart 1993b, Barker 2000*). En effet, le rôle des hormones sexuelles a été objectivé dans certains modèles animaux, notamment dans le modèle murin de lupus érythémateux systémique chez la souris NZBxNZW : chez les souris femelles, la stérilisation retarde la survenue de la maladie, chez les mâles, l'injection d'oestrogènes l'accélère. Une augmentation de l'incidence des AHMI serait ainsi observée chez les chiennes qui ont des cycles de reproduction anormaux (*Stewart 1993b*), incluant des cycles de longueur variable, de l'anostrus, des chaleurs silencieuses, un pyomètre ou des saignements prolongés en oestrus (*Dodds 1983a*).

Cependant, certaines publications mettent en évidence une prédisposition chez les femelles stérilisées également (*McCullough 2003, Burgess 2000*), ce qui remet en cause le rôle supposé des oestrogènes.

Selon d'autres travaux, les mâles non castrés sont nettement moins représentés que les mâles castrés (*Weinkle 2005*) et un effet protecteur des **androgènes** est avanvé pour expliquer la surreprésentation des femelles et des mâles castrés (*Quimby 1980*).

Toutefois, pour d'autres auteurs, il n'existe **pas de différence significative** entre les deux sexes. Par ailleurs, la prédisposition des femelles semble disparaître lorsque la population de l'étude est corrigée par le paramètre « âge », c'est-à-dire que dans la classe d'âge la plus représentée pour les AHMI, les femelles seraient majoritaires même en dehors du contexte d'AHMI, l'âge étant en réalité une variable de « confusion » (*Jacobs 1984*).

Enfin, pour certains auteurs, la prédisposition sexuelle varierait en **fonction de l'âge**. Ainsi, chez le jeune, en particulier de moins de 1 an, les mâles seraient plus représentés, alors que chez le chien d'âge moyen, les femelles sont plus fréquemment rencontrées *(Miller 2003)*.

C. Races prédisposées

En fonction des différentes publications, les races prédisposées aux AHMI varient. Cependant, la prédisposition du **cocker**, anglais et américain, est constante. Les autres races fréquemment citées incluent : le **caniche**, le **colley** et le **bobtail** *(Tableau 7)*.

Quelques races sont mentionnées de façon plus anecdotique dans certaines études : le **springer spaniel anglais** (*Klag 1993, Reimer 1999*), le **labrador retriever** (*Burgess 2000, Day 1996*), le **pinscher** (*Miller 2004*), le **bichon frisé** (*Miller 2004*), le **spitz finlandais** (*Miller 2004*), le **schnauzer nain** (*Weinkle 2005*), le **vizsla** (*Dodds 1983b*), le **scottish terrier** (*Dodds 1983b*), le **teckel à poils longs** (*Dodds 1983b*), le **setter irlandais** (*Person 1988*), le **lhassa apso**, le **shih tzu** et le **rottweiler** (*Cotter 1992*).

Remarque : Les races communément affectées par une AHMI ne sont pas plus représentés lors d'anémie immunologique arégénératives (*Stokol 2000*), à l'exception toutefois du **labrador retriever**, peu représenté lors d'AHMI, mais fréquemment atteint d'anémie immunologique arégénérative.

Les cockers américains représenteraient un tiers de tous les chiens atteints d'AHMI (*Miller 2004*). Dans d'autres races, la prédisposition est moins bien documentée et peut varier géographiquement. Les anomalies corpusculaires héréditaires et les problèmes de fragilité osmotique, doivent aussi être considérés dans le diagnostic différentiel dès que l'AHMI est suspectée dans une race pour laquelle ces anomalies sont reconnues. Ainsi, les principales anomalies érythrocytaires à évoquer sont le déficit en phosphofructokinase (présent surtout chez le springer anglais et à un moindre niveau chez le cocker anglais) (*Klag 1992*) et le déficit en pyruvate kinase (présent chez le basenji, le beagle, le west highland white terrier, le cairn terrier, le caniche nain, le carlin et le teckel) (*Giger 2005*).

Cette prédisposition raciale suggère qu'il existe un élément **génétique** dans la détermination de la sensibilité aux anémies immunologiques (*Barker 2000, McCullough 2003*).
Les arguments en faveur d'une composante génétique sont initialement fondés sur des études humaines familiales montrant :

- la concentration de plusieurs cas dans une même famille,
- le taux de concordance plus élevé chez les jumeaux monozygotes par rapport aux dizygotes,
- une prévalence différente selon les groupes ethniques.

Les modèles animaux confortent ces données initiales (*Dodds 1977, Stewart 1993b*). Dodds a, en effet, réalisé une étude sur deux familles de chiens (une famille de vizsla et une famille de scottish terrier) sur quatre générations afin de mettre en évidence une prédisposition familiale des affections sanguines à médiation immune. Dans la famille de vizsla, 10 animaux de la même famille qu'une chienne atteinte d'AHMI (descendants ou fraterie) présentent un TCD positif pour les IgG et/ou le C, 6 membres de la famille présentent également une thrombopénie à médiation immune. Même chose dans la famille de scottish terrier dans laquelle 8 membres ont des TCD positifs, 2 ayant développé une AHMI, et 5 une thrombopénie à médiation immune (*Dodds 1983b*) .

Même si une prédisposition raciale existe, les maladies à médiation immune apparaissent toutefois génétiquement complexes en raison de l'interaction de nombreux gènes différents. Parmi les gènes de susceptibilité, l'association prédominante et la mieux connue est celle qui lie les maladies auto-immunes et le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) chez l'homme et le chien (*Cotter 1992, Day 2000*). La recherche de gènes de susceptibilité hors de ce complexe est actuellement en cours. Par exemple, certains variants alléliques de gènes codants pour des cytokines pro-inflammatoires ou pour leurs récepteurs semblent

susceptibles d'augmenter la prédisposition à certaines maladies auto-immunes, en agissant sur le niveau d'expression de ces molécules.

D. Autres facteurs

1. Influence saisonnière

Plusieurs études rapportent une influence saisonnière des AHMI avec une augmentation de l'incidence au **printemps** (*Thébault 2005*, *Fournel 1994*, *Stewart 1993b*) ou en **été** (*Weinkle 2005*, *Klag 1993*), cependant cela n'est pas constant dans toutes les études (*Burgess 2000*), certaines mettant même en évidence une prédisposition **automnale** (*Duval 1996*) voire **hivernale** (*Jackson 1985*). La prédisposition printanière est également rencontrée chez l'homme (*Park 1987*) . La saisonnalité peut varier géographiquement (*Giger 2005*). Etrangement, il semblerait que l'influence saisonnière disparaisse lorsque l'AHMI est associée à une thrombopénie à médiation immune (TMI) (*Jackson 1985*).

Cette saisonnalité des AHMI pourrait s'expliquer par l'augmentation saisonnière des causes infectieuses sous-jacentes (*Thébault 2005*), notamment celles dues à un agent transmis par les morsures de tiques (babésiose, ehrlichiose) ou une exposition à un allergène pendant les mois chauds (*Giger 2005*). La saisonnalité pourrait aussi être liée à la période de vaccination (*Day 2000*) .

2. Groupe sanguin

❖ Rappels sur les groupes sanguins

Chez l'homme, à ce jour, **plus de vingt systèmes antigéniques érythrocytaires** ont été identifiés chez l'Homme : système ABO avec les antigènes A ou B, système Rhésus avec l'antigène D (présent + ou absent -), E ou e et C ou c, système Kell avec l'antigène K ou k ...

Dans l'espèce canine, plus d'une vingtaine de spécificités antigéniques regroupées en 11 systèmes de groupes sanguins, désignés par les lettres A à N, ou DEA 1 à 7 pour les sept premiers systèmes, ont été décrits. Le système DEA 1 est le mieux connu, voire le seul connu en pratique sous la dénomination de groupe A. Les autres groupes ont toutefois une importance théorique.

❖ Groupe sanguin et AHMI

Une étude portant sur 33 cas d'AHMI a cherché à évaluer si les groupes sanguins pouvaient constituer un facteur de risque pour la survenue d'AHMI chez le chien. Le groupe sanguin le plus rencontré chez les chiens atteints d'AHMI est le DEA.4, mais comparé à une population de référence, ce groupe sanguin est également celui qui est le plus représenté dans la population canine (98% des chiens positifs pour ce groupe). Chez le **cocker**, il semble que l'antigène **DEA 7** puisse avoir un effet protecteur sur la survenue d'AHMI, ainsi, les cockers porteurs de l'antigène DEA 7 auraient moins de chance de développer une AHMI. Plusieurs mécanismes peuvent être proposés pour expliquer l'augmentation du risque d'AHMI chez les chiens ne possèdant pas cet antigène DEA 7. En particulier chez ces chiens, l'absence d'une protéine membranaire cellulaire fonctionnelle pourrait conduire à un déficit fonctionnel au niveau cellulaire et par conséquent à une lyse cellulaire. De la même façon, chez l'homme, une des glycoprotéines qui détermine le groupe sanguin, dite glycoprotéine « Kidd », est aussi une importante protéine de transport de l'urée. Les rares hommes homozygotes qui ne possèdent pas cette glycoprotéine sont susceptibles de développer une hémolyse induite par l'urée car les cellules perdent leur capacité à transporter cette molécule à travers la membrane

cellulaire (*Westhoff 2007*). Une autre hypothèse avancée pour expliquer le rôle protecteur de certains antiènes est leur participation à la stabilité de la membrane érythrocytaire. Chez les hommes atteints du syndrome « Rhésus nul » (*Cartron 1999*), par exemple, l'absence des antigènes Rhésus est associée à une forme et une survie cellulaire anormales et pourrait conduire à une anémie hémolytique sévère, bien que certains individus affectés puissent seulement avoir une anémie faible compensée. Enfin, l'absence de l'antigène DEA 7 pourrait permettre l'expression d'un auto-antigène unique ou la modification de la membrane cellulaire de telle façon que la production d'auto-anticorps soit stimulée ou que des cellules T autoréactives soient activées. Les anticorps anti-DEA 7 sont présents chez 20 à 50 % des chiens DEA 7 négatifs, et un de ces anticorps pourrait être auto-réactif. Cependant, bien que la structure et la fonction du DEA 7 soient connues, son rôle dans la survenue des AHMI est encore inconnu (*Miller 2004*).

E. Bilan des différentes études

(tableau 7)

Etudes	Nombre de chiens	Prédisposition raciale	Prédisposition sexuelle	Echelle d'âge
Dodds 1977		Caniche, **cocker**, setter irlandais	Non enregistré	Non enregistré
Halliwell 1978		Caniche, **cocker**, berger allemand	F	9 mois - 9 ans Moy. 4,7 ans
Bennett 1981		Colley	Aucune	7 mois -10 ans Moy. 3,6 ans
Switzer 1981		Aucune	-M si inférieur à 1 an -F si supérieur à 4 ans	2 mois – 15 ans
Dodds 1983b	223	Bobtail, teckel à poils longs, vizsla, scottish terrier, **cocker américain**	F (M plus sévèrement atteints et moins bonne réponse au traitement)	
Jacobs 1984	17		F, stérilisées	1-14 ans Moy 5.8 ans
Jackson 1985	29	Aucune	-F pour AHMI -M pour AHMI + TMI	1 an – 12 ans Moy. 6,6ans
Person 1988	35	-Animaux de grande taille et de race définie -Setter, bobtail	M	Jeunes et jeunes adultes (2 -7 ans)
Klag 1993	42	**Cocker anglais**, springer spaniel anglais, colley	F différence non significative	1- 13 ans Moy. 6,4 ans (+/- 3,4 ans)
Day 1996	14	**Cocker anglais**, labrador retriever	Aucune	5.07 +/- 1.93 ans
Reimer 1999	70	**Cocker anglais**, springer spaniel anglais	F, surtout stérilisées différence non significative	1-13 ans Moy. 6 ans
Burgess 2000	60	**Cocker anglais**, labrador retriever	F, stérilisées	1-13 ans Moy. 6,5 ans
Carr 2002	72	**Cocker anglais**	F	1-13 ans Moy. 6,8 ans (+/- 3,1 ans)
Mason 2003	18	**Cocker américain**	F	3 -10 ans Moy. 7 ans
Miller 2004	33	**Cocker anglais**, bichon frisé, pinscher, colley à poils longs, spitz finlandais	F Différence non significative	
Weinkle 2005	151	**Cocker anglais**, schnauzer nain	M castrés, F	-6,6 ans (+/-2,9 ans) -Très peu de CN < à 2 ans

Tableau 7 : Synthèse bibliographique des prédispositions épidémiologiques lors d'AHMI

F = femelle, M = mâle, Moy. = moyenne

II. Critères cliniques

La réaction immunologique induit une destruction érythrocytaire accélérée se traduisant du point de vue clinique par des symptômes d'insuffisance fonctionnelle regroupés sous le terme de **syndrome anémique**.

Si l'hématocrite devient trop bas (< 22,5 %), l'organisme s'adapte en provoquant une tachycardie et une redistribution préférentielle du sang aux organes vitaux (cœur et cerveau), d'où une hypoxie des autres organes (reins, foie, rate, intestins...) (*Thébault 2005*).

La majorité des signes cliniques est due à l'anémie et aux effets de l'hypoxie sur les systèmes organiques (foie, poumons, cœur, reins et intestins), les signes sont aussi imputables à l'érythrophagocytose, à l'activité immunologique (*Day 2000*) et à la réaction inflammatoire *(Miller 2003)*.

Les signes cliniques peuvent survenir de façon aiguë (classes I et II) ou chronique (classes III, IV et V) (*Stewart 1993b*). Il est important de signaler qu'une AHAI à anticorps chauds ne survient pas forcément de façon brutale, avec des signes d'hémolyse fulminante, mais que son développement peut être insidieux (*Barker 2000*). Ainsi, la forme la plus répandue d'AHMI chez le chien s'installe de façon chronique (quelques jours à quelques semaines) mais une installation aiguë, fréquemment associée à une hémolyse intra vasculaire est également possible (*Day 2000*).

Remarque : des signes cliniques similaires sont rencontrés dans les formes centrales d'anémie immunologique.

A. Forme classique : hémolyse due aux anticorps chauds

Les principaux symptômes observés par les propriétaires sont en général l'abattement, la pigmenturie, l'anorexie et la fatigue (*Barker 2000, McCullough 2003, Switzer 1981, Thébault 2005*).

1.Symptômes liés à l'anémie

1.1.Baisse de l'état général

Les signes cliniques varient en fonction du degré de l'anémie : **dépression, léthargie, intolérance à l'exercice, faiblesse** et **syncopes** (*Barker 2000*). Les collapsus brutaux ou les syncopes sont, toutefois, des signes peu fréquents *(Miller 2003)*.

1.2.Pâleur des muqueuses

Une **coloration rose pâle à blanche** des muqueuses est un signe d'appel d'anémie sans pour autant être pathognomonique. En effet, toute affection accompagnée d'une hypoperfusion périphérique marquée (état de choc, insuffisance cardiovasculaire) peut être associée à une pâleur des muqueuses secondaire à la vasoconstriction périphérique compensatrice. Lors d'anémie modérée, la coloration des muqueuses est souvent normale (*Gaillot 1998*).

1.3.Modifications cardiovasculaires et respiratoires

Une **polypnée** et un **souffle cardiaque** lié à la baisse de viscosité du sang (souffle

systolique, doux, d'intensité faible, surtout audible en région apexienne gauche) constituent aussi des signes d'appel d'un syndrome anémique (*Badylak 1981*). Le souffle anémique indique un hématocrite bas (généralement inférieur à 20 % chez le chien).

Une **tachycardie compensatrice**, décelée chez environ un chien sur trois lors d'AHMI (*Miller 2003*) et un **pouls bondissant** (*Klag 1992*) ou **rapide et faible** (*Switzer 1981*) peuvent être présents.

La présence d'une **dyspnée** doit faire suspecter des complications, notamment une thromboembolie pulmonaire.

2.Symptômes liés à l'hyperhémolyse

2.1.Hyperthermie

Une hyperthermie est présente dans environ la **moitié** des cas d'AHMI (*Thébault 2005*).
Lors d'hémolyse intra vasculaire aiguë, la libération de substances globulaires pyrogènes peut entraîner une hyperthermie. L'hyperthermie associée à une anémie peut aussi être simplement le témoin d'une origine infectieuse ou inflammatoire de celle-ci (*Gaillot 1998*). Enfin, l'hyperthermie peut être attribuée à une réponse immunitaire importante (*Barker 2000*). La présence d'une hyperthermie doit donc alerter le clinicien sur la possibilité d'une origine immunologique de l'anémie (*Klag 1992*).

2.2.Pigmenturie

La couleur des urines varie selon plusieurs critères : vitesse d'installation, intensité de l'anémie et lieu de destruction des érythrocytes.

Classiquement,

- lors d'hémolyse extravasculaire, on retrouve une **urobilinurie** (forme d'élimination urinaire de la bilirubine conjuguée), les urines sont donc très jaunes. Une **bilirubinurie** peut également être présente lors d'hémolyse extravasculaire importante.
- lors d'hémolyse intra vasculaire, la coloration varie en fonction de l'intensité de l'hémolyse et donc de l'hémoglobinémie. On retrouve dans les urines une **bilirubinurie**, une **hémosidérinurie** (urines de couleur marron « marc de café ») ou une **hémoglobinurie** (urines de couleur noir d'encre) (*Gaillot 1998*).

Etant donné le faible seuil d'excrétion urinaire de la bilirubine chez le chien, la bilirubinurie est présente précocement et précède en général l'hyperbilirubinémie et l'ictère. L'hyperbilirubinurie semble constante chez les chiens avec une affection hémolytique (*Giger 2005*).

2.3.Ictère

Lorsque la concentration sérique en bilirubine dépasse **2 mg/dL**, l'ictère apparaît au niveau des muqueuses gingivale et sclérale, la peau devient ictérique pour des concentrations plus élevées.

L'association d'une pâleur des muqueuses et d'un ictère suggère fortement la possibilité d'une hémolyse intense. Un ictère modéré (subictère) associé à une anémie peut toutefois être le reflet d'un recyclage de l'hémoglobine à la suite d'hémorragie interne (*Gaillot 1998*).

Par ailleurs, lors d'AHMI, l'ictère peut être **discret ou absent** en particulier dans les formes atténuées ou chroniques (*Giger 2005*), son absence ne doit donc pas constituer un critère d'exclusion d'une AHMI *(Miller 2003)*.

2.4.Splénomégalie et hépatomégalie

L'association d'une anémie à une splénomégalie et parfois une hépatomégalie est compatible avec une hémolyse extravasculaire intense (*Gaillot 1998*). Toutefois, celles-ci sont inconstantes *(Miller 2003)*.

3.Autres signes

3.1.Signes digestifs

L'**anorexie** constitue un des principaux motifs de consultation mais est un signe peu spécifique.

Des **vomissements** (*Day 2000*) et de la **diarrhée** sont rapportés occasionnellement (*Bennett 1981, Klag 1992, Miller 2003, Giger 2005*), de même qu'une **constipation** et du **pica** (*Lewis 1989*).

Un **inconfort abdominal** peut être noté, et serait du à l'hépato-splénomégalie, ainsi qu'aux signes digestifs.

3.2.Lymphadénopathie

Une lymphadénopathie est fréquemment rapportée (*Day 2000, Lewis 1989, McCullough 2003*) mais elle est inconstante *(Miller 2003)*.
La lymphadénopathie peut être attribuée à une réponse immunitaire importante (*Barker R. N. 2000*). Toutefois, cette polyadénomégalie peut reconnaître d'autres causes.

3.3.Divers

Une polydipsie a été occasionellement rapportée lors d'AHMI (*Bennett 1981*).

4. Synthèse *(tableau 8)*

	Reimer 1999	*Klag 1993*	*Mason 2003*	*Burgess 2000*	*Bennett 1981*	*Person 1988*	*Fournel 1994*
Anorexie	99 %	90 %	83 %		37 %	28,6%	90%
Léthargie	99 %	86 %	94 %	93 %	74 %	65,7%	80%
Muqueuses pâles	97 %	76 %		77 %	100 %	76,6%	76%
Ictère	51,4 %	50 %	67 %	45 %	21 %	20%	
Souffle cardiaque	47 %			27 %	10.5 %	2.8%	
Fatigue	46 %	67 %			74 %	25,8%	
Splénomégalie	43 %					22,8%	
Hépatomégalie	23 %					8,6%	
Hépato ou splénomégalie		25%		38 %			
Tachypnée	30 %				10.5 %	40%	70%
Tachycardie	28 %	33 %			53 %	57,1%	33%
Pigmenturie	13 %		44 %	32 %		68,5%	90%
Vomissement			33 %		16 %		
Diarrhée			17 %			5,8%	

Tableau 8 : Synthèse bibliographique des principaux symptômes rencontrés lors d'AHMI (forme classique)

B. Formes particulières dues aux anticorps froids

1.Maladie des agglutinines froides

Les signes cliniques prédominants dans la maladie des agglutinines froides se développent surtout après une exposition à une **température basse** et incluent une **cyanose** et une **nécrose des extrémités**, en particulier des oreilles, de la truffe, des doigts et de la queue (*Barker 2000*). Cela peut évoluer vers la gangrène. Ces lésions sont dues à des troubles circulatoires engendrés par l'agglutination des hématies dans les capillaires des zones périphériques, où la température est nettement inférieure à la température centrale du chien (*Fournel 1994*).

2.Hémolyse *a frigore*

On observe des crises hémolytiques suite à une exposition au froid. Cela est très rare chez le chien.

C. Complications

Les complications les plus fréquentes lors d'AHMI incluent un choc circulatoire et des troubles de la coagulation avec en particulier une coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD) et des affections sanguines thromboemboliques (plus particulièrement une thromboembolie pulmonaire).

1.Choc circulatoire

La présence d'une anémie sévère, d'une anorexie, de pertes hydro-électrolytiques suite aux vomissements et à la diarrhée peut rapidement conduire à une diminution de la quantité de GR, du volume intra vasculaire et du débit sanguin et à des déséquilibres électrolytiques, cette combinaison pouvant être mortelle. Un collapsus, un pouls fémoral faible, des muqueuses extrêmement pâles avec un temps de recoloration capillaire augmenté, des extrémités froides (*Gaillot 1998, Thébault 2005*) et une tachycardie ou bradycardie extrêmes doivent alerter le clinicien sur la possibilité d'une choc circulatoire, et une réanimation immédiate doit être entreprise pour restaurer le volume intra vasculaire et la pression sanguine (*Klag 1992*).

2. Troubles de la coagulation, thrombopénie, CIVD et thromboembolie

2.1.Thrombopénie

Les patients avec une AHMI peuvent aussi présenter une thrombopénie. L'association d'une AHMI et d'une thrombopénie est **fréquente**, jusqu'à 65 % (*Scott-Moncrieff 2001*) à 67% des cas selon les études (*Fournel 1994*). Cependant, il semblerait qu'un faible pourcentage (<20%) seulement des chiens thrombopéniques présentent simultanément des signes cliniques de thrombopénie (*McCullough 2003*). Ces signes se manifestent principalement si les plaquettes sont inférieures à 50 000/µL de sang et incluent des pétéchies, des ecchymoses, de l'épistaxis, du méléna, une hématurie et des hémorragies multiples, notamment rétiniennes (*Switzer 1981*).
Il est difficile de déterminer si la thrombopénie résulte d'un mécanisme immunologique ou d'une consommation par une CIVD précoce (*Cotter 1992*).

2.2.CIVD et état d'hypercoagulabilité

La CIVD apparaît comme un **risque majeur** lors d'AHMI (*McCullough 2003*) et attendrait jusqu'à 32 (*Carr 2002*) voire 45 % des chiens souffrant d'AHMI (*Scott-Moncrieff 2001*). D'après une étude de Scott-Moncieff mesurant les paramètres de l'hémostase chez 20 chiens atteints d'AHMI, environ la moitié des chiens seraient dans un état d'hypercoagulabilité au moment du diagnostic. Ceci n'est pas une complication tardive mais apparaît au contraire précocement dans le développement des AHMI (*Scott-Moncrieff 2001*).

La CIVD est une **affection thrombo-hémorragique**, il s'agit d'une **coagulopathie de consommation.**
Cela se traduit par :

- la présence de **schizocytes** sur le frottis sanguin, ce sont des fragments irréguliers de GR qui surviennent suite à la présence de filaments de fibrine dans les vaisseaux ;
- une **thrombopénie**
- une **modification des temps de coagulation** avec une **augmentation du temps de céphaline activée** (exploration des voies endogène et commune), du **temps de Quick** (exploration voies exogène et commune) et du **temps de thrombine** (exploration de la transformation du fibrinogène en fibrine). Une **augmentation** des **produits** de **dégradation** de la **fibrine** et de la **concentration en complexes solubles**, une **diminution** de la concentration en **fibrinogène** et en **anti-thrombine III** sont également observés. Le temps de saignement peut être normal sauf si le chien est thrombopénique ou atteint d'un autre trouble de l'hémostase concomitant *(Miller 2003).*

Le diagnostic définitif de CIVD chez le chien est souvent difficile à établir.

La **pathogénie** de l'état d'hypercoagulabilité et de la CIVD lors d'AHMI semble être **multifactorielle** et les causes impliquées sont multiples :

- La **libération de substances stromales des GR lors de l'hémolyse** pourrait initier une CIVD. En effet, l'administration d'érythrocytes autologues hémolysés à des chiens conduit à un état d'hypercoagulabilité (*Carr 2002*).

- Le **facteur de nécrose des tumeurs** (**TNF,** tumor necrosis factor) ou facteur tissulaire jouerait un rôle important lors de CIVD. Ce facteur est une cytokine synthétisée par les cellules de la lignée blanche suite à différents stimuli. Sa production par les leucocytes est induite *in vitro* quand les GR sont sensibilisés avec des allo-anticorps (*Carr 2002*).
Par ailleurs, l'hémoglobine libre elle-même n'est pas pro-coagulante mais, en combinaison avec d'autres substances, elle peut déclencher une CIVD. En effet, l'hémoglobine libre, en présence d'endotoxines, induirait une augmentation de la production de TNF par les cellules endothéliales *in vitro*. De la même façon, la production de ce facteur augmente de façon plus importante chez des souris transfusées avec de l'hémoglobine libre si elles ont été au préalable soumises à une endotoxine que si elles ont reçu des lipopolysaccharides seuls. Il a aussi été prouvé que l'hémoglobine amplifiait la fixation des endotoxines sur les cellules endothéliales humaines avec pour conséquence une augmentation de l'expression du facteur tissulaire. Etant donné l'ischémie induite par l'anémie chez certains animaux atteints d'AHMI et l'administration de corticoïdes avec leur effet potentiellement nocif sur l'intégrité de la muqueuse gastro-intestinale, les endotoxines pourraient pénétrer dans la circulation lors d'AHMI et jouer un rôle pro coagulant, en particulier si de l'hémoglobine libre est présente.

- D'autres **cytokines pro-inflammatoires et médiateurs de l'inflammation** pourraient aussi être impliqués dans la genèse de lésions vasculaires. Ces lésions peuvent potentialiser la formation d'un caillot initiée par l'auto-agglutination de GR et la libération d'éléments cytoplasmiques des GR lors d'hémolyse (*Weinkle 2005*).

- **L'hémoglobine libre** peut aussi prédisposer à un état d'hypercoagulabilité en fixant **l'oxyde nitrique** (NO). Le NO est vital pour la vasodilatation et c'est aussi un inhibiteur potentiel de l'agrégation plaquettaire. Chez les chiens avec une AHMI, l'hémoglobine libre, même si elle est présente en faible quantité, pourrait inactiver le NO et conduire par conséquent à une augmentation de l'agrégation plaquettaire (*Carr 2002*).

- Le développement d'un état d'hypercoagulabilité pourrait également être associé à la présence d'**anticorps anti-phospholipides** qui amplifient l'agrégation plaquettaire et inhibent les systèmes de régulation des voies de la coagulation (*Day 2000*). **L'anticoagulant lupique** est un anticorps dirigé contre les phospholipides qui interfère avec la formation de l'activateur de la prothrombine. La première description de ces anticorps ayant été réalisée chez des patients présentant un LES, le terme anticoagulant lupique a été adopté, mais ces anticorps anti-phospholipides ont par la suite été détectés chez des patients atteints d'autres affections : à médiation immune, induites par les médicaments, néoplasiques et infectieuses. Ces anticorps présentant une réactivité croisée avec la cardiolipine, l'antigène phospholipidique détecté dans les tests standarts pour la syphilis, le terme anticorps anticardiolipine est aussi parfois utilisé (*Stone 1994*). Les anticorps anti-phospholipides sont retrouvés chez un grand nombre de patients humains

atteints d'AHMI idiopathique. Dans une étude concernant des femmes atteintes de LES, les concentrations en anticorps anti-phospholipides ont été comparées chez des patients avec et sans anémie hémolytique. Les concentrations sont plus élevées chez les patientes atteintes d'AHMI et la thrombopénie est aussi plus commune dans ce groupe. Bien que 63,7 % des patients avec une AHMI et une thrombopénie aient des taux élevés en anticorps anti-phospholipides, aucun des patients avec une thrombopénie seule, sans hémolyse, n'a de titre élevé. Par ailleurs, l'association entre ces anticorps et la thrombose chez l'homme est bien documentée. Ainsi même si le rôle de ces anticorps anti-phospholipides n'est pas connu précisément en médecine vétérinaire, ils semblent jouer un rôle important dans l'augmentation du risque de thromboembolie lors d'AHMI (*Carr 2002*).

- Enfin, les **corticoïdes** ont été impliqués dans le développement d'un état d'hypercoagulabilité mais dans l'étude de Scott-Moncrieff, il n'y a pas de différence entre les chiens ayant reçu de la prednisone et les autres. Cependant, la durée du traitement chez les chiens en ayant reçu n'était que de 7 jours, une durée plus longue aurait peut-être pu engendrer une différence entre les 2 groupes (*Scott-Moncrieff 2001*).

2.3. Thromboembolie

La présence d'une CIVD ne semble pas associée à une augmentation du développement de thromboses (*Carr 2002*) ou du taux de mortalité (*Scott-Moncrieff 2001*) chez les chiens atteints d'une AHMI. C'est plutôt l'état d'hypercoagulabilité qui entraînerait le développement de thromboses. Ainsi, les facteurs de risque pour le développement d'une thromboembolie incluent la combinaison d'un **état d'hypercoagulabilité**, une **stase veineuse** et des **lésions endothéliales** (triade de Virchow), le tout pouvant être exacerbé par le confinement en cage, le décubitus et la pose de cathéters (*Weinkle 2005*, *Johnson 2002*). Par ailleurs, les plaquettes circuleraient sous une forme activée chez de nombreux chiens atteints d'une AHMI comme en atteste une étude réalisée sur 20 chiens par Weisse et Brazell en 2006, ce qui pourrait participer au développement de thromboembolie (*Weiss 2006*).

Chez les chiens atteint d'une AHMI, les **thromboses** sont **fréquentes** lors de l'examen nécropsique : elles concernent en fonction des études 44% (*Klag 1993*) à 80% des chiens (*Carr 2002*). Toutefois, leur incidence pourrait être sous estimée du fait des difficultés de diagnostic.

Les **localisations** sont **variées** : une localisation **pulmonaire** est **la plus fréquente**, seule ou en association avec d'autres localisations, (*Klag 1993*).

Les autres localisations concernent la **rate**, la **veine porte**, les **reins**, le **cœur**, le **foie**, l'**hypophyse**, l'**estomac**, la **peau** et la **veine céphalique**. Dans la majorité des cas, des thrombi sont retrouvés dans **plusieurs organes**.

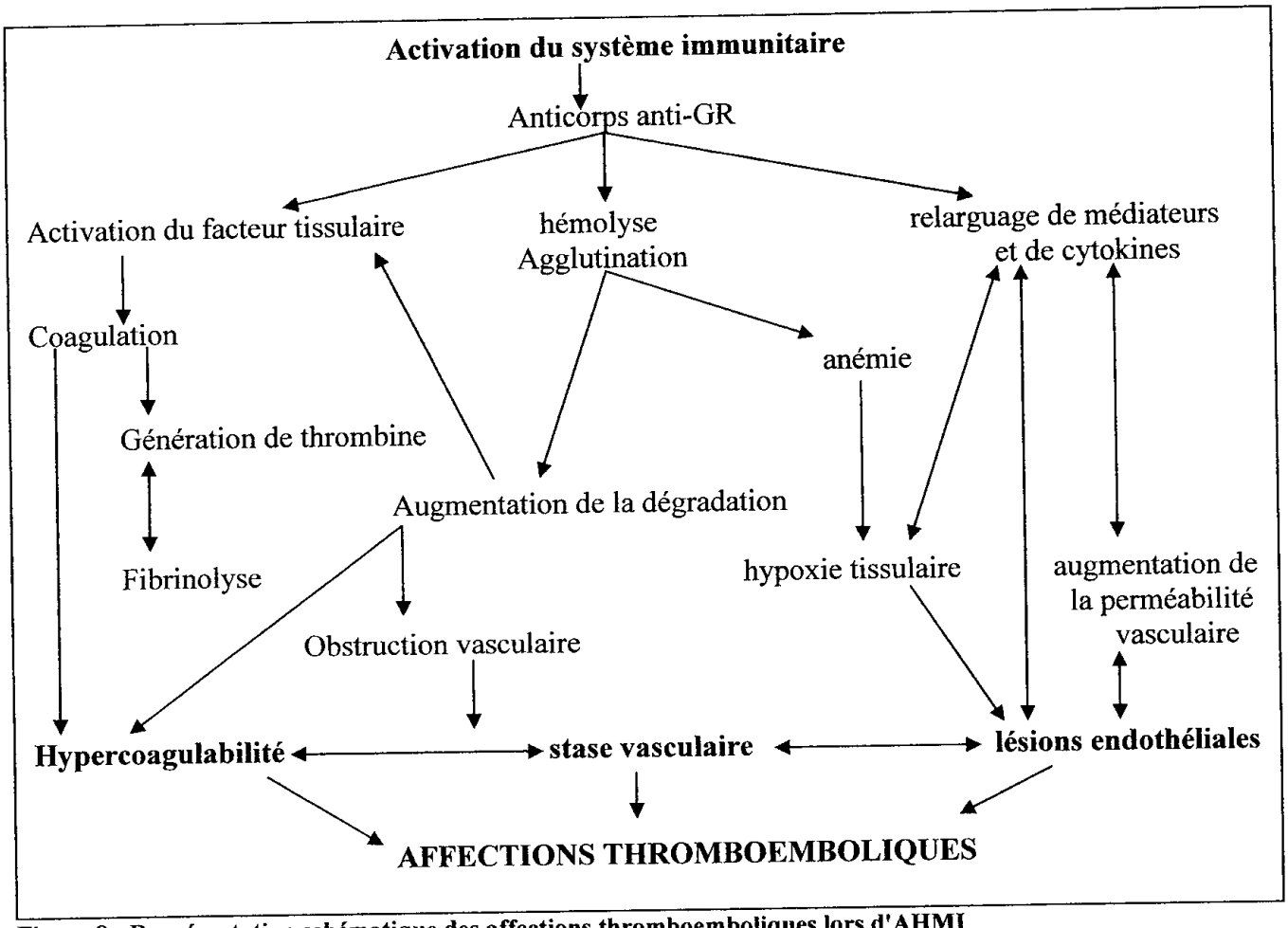


Figure 8 : Représentation schématique des affections thromboemboliques lors d'AHMI

III. Critères biologiques

A. Paramètres hématologiques

1. Anémie

1.1.Intensité de l'anémie

Lors d'AHMI, la **sévérité** de l'anémie est **variable**, de modérée à sévère *(McCullough 2003, Switzer 1981)*.

Cependant, le plus souvent, l'hématocrite est inférieur à 20% (*Day 2000, Klag 1993*). L'hématocrite varie de **4** à **35 %** (*Burgess 2000, Weinkle 2005, Carr 2002, Day 1996*). **L'hématocrite moyen** est de **14 %** (*Burgess 2000*), **15 %** (*Weinkle 2005*), **16 %** (*Carr 2002*) ou **18 %**(*Day 1996*) en fonction des études.

L'intensité de l'anémie serait significativement plus élevée dans les AHMI primaires que dans les AHMI secondaires (*Fournel 1994*).

1.2.Caractérisation de l'anémie

Dans la majorité des cas, l'anémie est **normocytaire** (volume globulaire moyen (VGM) dans les valeurs usuelles **normochrome** (concentration corpusculaire moyenne

(CCMH) et teneur corpusculaire moyenne (TCMH) en hémoglobine dans les valeurs usuelles (*Thébault 2005*).

Elle peut quelquefois être **macrocytaire** (VGM augmenté) (*Fournel 1994*), notamment si la réticulocytose et l'érythroblastose surviennent rapidement, et plus rarement **hypochrome** (TCMH diminuée). La présence d'une macrocytose et d'une hypochromie évoque la présence de nombreux **réticulocytes** circulants (taille supérieure et concentration en hémoglobine inférieure à celles des GR matures), cela traduit alors le caractère régénératif de l'anémie (*Gaillot 1998*). Toutefois, le caractère macrocytaire n'est pas spécifique et peut aussi résulter d'un effet osmotique ou d'une auto-agglutination des GR (*Jones 1991*).

Une **anisocytose érythrocytaire** et une augmentation de la distribution du volume érythrocytaire sont observées si des réticulocytes et des sphérocytes sont présents simultanément (*Poitout 1994-1995*).

Remarque : Des artéfacts peuvent survenir. Ainsi, le volume corpusculaire moyen et la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine peuvent être faussement augmentés et l'hématocrite faussement diminué si une auto-agglutination est présente. La concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine peut être diminuée si une réticulocytose est présente, la valeur peut être normale dans certains cas ou artificiellement augmentée si une hémoglobinémie est présente (*Cotter 1992*, *Poitout 1994-1995*).

2. Frottis sanguin

Rappels (*Guelfi 1995*)

**Morphologie normale des GR*

Chez le chien, les hématies apparaissent comme des **cellules arrondies**, d'environ **7µ** de diamètre, une légère anisocytose (différence de taille) est physiologique. Elles ont une teinte **jaune orangé** (éosinophile) et une légère **pâleur centrale**, absente en queue de frottis, plus marquée si on observe le corps de frottis. Aux endroits assez épais du frottis (tête et corps), on observe souvent un chevauchement des hématies entre elles et des GR fortement colorés à la périphérie et décolorés en leur centre (torocytes).

**Morphologie anormale des GR*

- **anisocytose** : hématies de tailles différentes sur le frottis
- **anisochromie** : hématies de colorations différentes sur le frottis
- **polychromatophilie** : hématies gris bleuté, souvent de plus grand diamètre (jeunes hématies : réticulocytes)
- **poïkiloytose** : hématies de formes différentes sur le frottis
- **sphérocytes** : hématies de très faible diamètre et fortement colorés
- **schizocytes** : fragments d'hématies. Ils se forment en cas de fragilité exagérée des hématies, d'agressions immunologiques ou surtout physiques
- **érythroblastes** : hématies nucléées. La présence d'érythroblastes circulants est possible au cours d'anomalies diverses : anémies régénératives, troubles spléniques, dysérythropoièse, leucémies…

Encadré 2 : Rappels sur la morphologie normale et anormale des GR

2.1.Polychromatophilie, anisocytose et anisochromie

Les cellules polychromatophiles sont des cellules de **grande taille** et de coloration **violette** (couleur violette car présence simultanée d'hémoglobine, rouge, et d'ARN, bleu, dans le cellule et coloration différente car leur charge en hémoglobine est inférieure à celle des GR normaux), qui correspondent, aux colorations usuelles, aux réticulocytes. Une polychromatophilie signe un phénomène **régénératif**.

L'examen du frottis met alors en évidence une anisocytose et une anisochromie (*Gaillot 1998*) en particulier si les polychromatophiles et les sphérocytes co-existent.

Figure 9 : Anisocytose érythrocytaire, polychromatophilie et sphérocytose
(Laboratoire d'Immunologie et Hématologie, ENVL)

2.2.Sphérocytose

Les sphérocytes *(figure 9)* sont des GR de **petite taille** (microcytaires), très **denses, sphériques**, de **coloration homogène** (absence de pâleur centrale car non biconcaves) et de **déformabilité diminuée** (*McCullough 2003*). Ils correspondent à ce qui reste des hématies après **phagocytose partielle** par les macrophages, lorsque ceux-ci enlèvent une portion de la membrane érythrocytaire qui est fixée à un anticorps ou au C *(Miller 2003)*. Ils sont détruits lors de leur passage dans la microcirculation splénique (*Poitout 1994-1995*). Leur perte d'élasticité conduit, en effet, à un arrêt dans les sinusoïdes de la rate, ce qui permet leur phagocytose par les macrophages ayant des récepteurs pour les fragments Fc et le C3b (*Lewis 1989*).

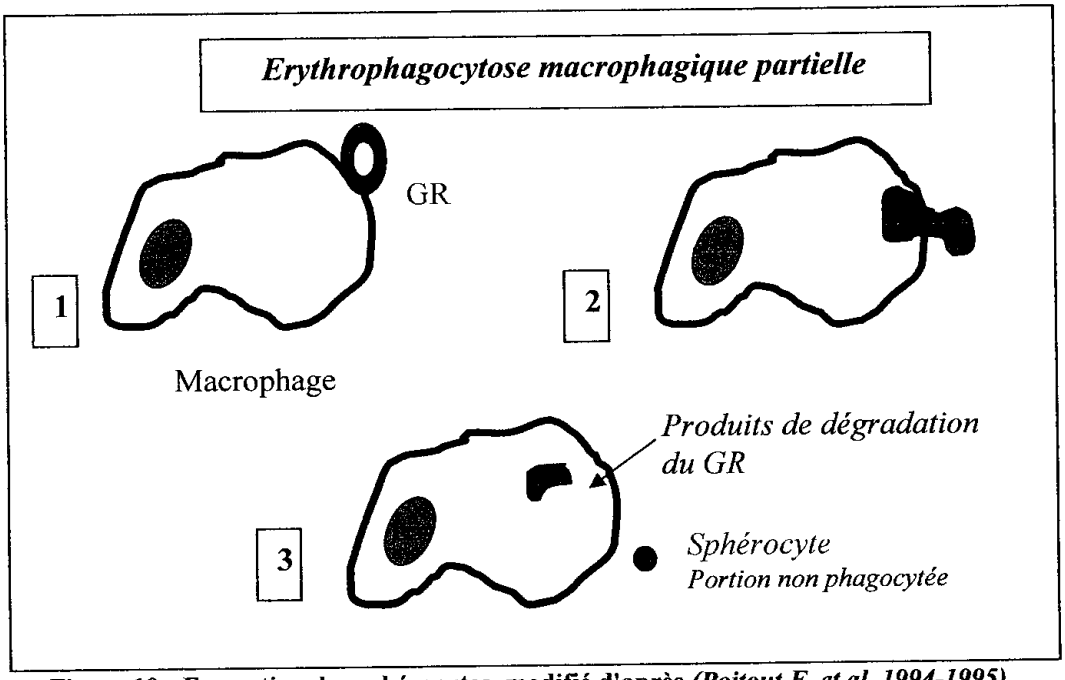


Figure 10 : Formation des sphérocytes, modifié d'après *(Poitout F. et al. 1994-1995)*

Le degré de sphérocytose dépend du mode de destruction des GR. Dans les hémolyses médiées par le C, la sphérocytose est en général peu évidente car la destruction des GR est le plus souvent totale. Au contraire, les affections médiées par les IgG impliquent plus fréquemment une sphérocytose (*Stewart 1993b*).

Les sphérocytes doivent être observés dans la **zone d'étalement** des GR. A l'extrémité du frottis, les GR normaux sont très étalés, perdent leur pâleur centrale et peuvent être confondus avec des sphérocytes. L'examen du frottis sanguin doit donc tenir compte des zones de distribution des GR. Les sphérocytes peuvent aussi être confondus avec des fragments de GR qui se condensent et prennent une forme arrondie (*Thrall 2004*).

Les sphérocytes représentent un **argument majeur** en faveur des **AHMI** chez le chien (*Gaillot 1998*). Ils constituent un signe prédominant lors de l'installation de l'affection et sont encore présents en grand nombre au début du traitement immunosuppresseur. Leur disparition correspond à une diminution de la production d'anticorps (*Poitout 1994-1995*). Chez les chiens atteints d'une AHMI, une sphérocytose est mise en évidence chez **67 %** (*Klag 1993*), **75%** (*Burgess 2000*), **78%** (*Mason 2003*), **89%** (*Weinkle 2005*) voire **94%** des cas (*Carr 2002*).

Cependant, la présence de sphérocytes n'est **pas spécifique** des AHMI. En effet, un petit nombre de sphérocytes peut aussi révéler une **anémie à corps de Heinz**, une **anémie post-transfusionnelle**, une **CIVD** (dans ce cas on a fréquemment d'autres formes de fragmentation érythrocytaire : schizocytes, acanthocytes, échinocytes (*Poitout 1994-1995*), une **hypophosphatémie**, une **intoxication par le zinc** (*Klag 1992*) et une **hémolyse microangiopathique** (*Giger 2005*). Dans ces différents cas, toutefois, le pourcentage de sphérocytes observés est en général inférieur à 25 % du nombre total de GR (*Poitout 1994-1995*) alors que ce pourcentage est plus élevé lors d'AHMI : de **30 à 50 %** du nombre total de GR (*Gaillot 1998*). Certains auteurs considèrent qu'une sphérocytose **supérieure à 50 %** est diagnostique d'une **AHMI** chez le chien (*Barker 2000*).

Une **sphérocytose héréditaire** liée à des défauts de la membrane érythrocytaire est décrite chez l'homme, et a aussi été rapportée dans certaines races de chien (*Giger 2005, Miller 2003).*

Remarque : lors d'anémie hémolytique induite par le zinc, on observe une anémie sévère macrocytaire régénérative avec une sphérocytose. Le leucogramme indique une leucocytose neutrophilique avec déviation à gauche et une monocytose. Une thrombopénie est fréquemment associée. L'intoxication au zinc chez le chien se traduit par une crise hémolytique aiguë qui peut être accompagnée de sphérocytose. La possibilité d'une AHMI doit être écartée par la réalisation d'un test de Coombs. L'anémie hémolytique avec sphérocytose est attribuée à une lésion des GR par le zinc avec une augmentation de l'activité macrophagique d'où une érythrophagocytose ou une modification de la membrane des GR avec formation de sphérocytes. L'hémolyse peut être intra ou extravasculaire (*Torrance 1987, Latimer 1989*). Il faut donc bien différencier ce type d'anémie, même s'il est très rare, des AHMI.

2.3.Hémoparasites

Le frottis sanguin peut également permettre de mettre en évidence des hémoparasites qui sont responsables secondairement d'une AHMI, en particulier les piroplasmes dans les GR. La mise en évidence de morulas d'*ehrlichia* ou d'inclusions dans les monocytes, les granulocytes et les thrombocytes est également possible.

2.4.Fantômes de GR

Lors d'hémolyse intra vasculaire, des « fantômes » de GR peuvent être retrouvés à l'examen du frottis sanguin (*Thrall 2004, Scott 2000*).

2.5.Images d'érythrophagocytose

Des images d'érythrophagocytose par des monocytes sanguins peuvent être présentes, mais elles restent rares (*Scott 2000*).

2.6.Divers

Enfin le frottis sanguin peut mettre en évidence une **origine non immune** (corps de Heinz, eccentrocytes...) de l'anémie (*Scott 2000*).

Un contingent de **lymphocytes granuleux**, en faveur essentiellement d'une ehrlichiose, peut également être observé.

3. Réticulocytes

3.1.Définition et caractéristiques

Les réticulocytes sont des **érythrocytes immatures, nucléés**, qui traduisent une **érythropoïèse active**.

La présence de réticulocytes est classiquement associée à :

- une **polychromatophilie**, car les réticulocytes ont une coloration différente des GR normaux du fait de la présence d'ARN,
- une **macrocytose** (augmentation du volume glomérulaire moyen) et une **anisocytose**, car ils ont une plus grande taille que les GR normaux,
- et une **diminution** de la **concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine** car les réticulocytes contiennent moins d'hémoglobine (*Fernandez 2000*).

Les réticulocytes contiennent un **ARN résiduel**, qui peut précipiter dans le réseau réticulé et être teinté par certains colorants supra vitaux, comme le **bleu de méthylène** ou le **bleu de crésyl brillant** *(figure 11)* (*Cowgill 2003, Giger 2005, Fernandez 2000*).

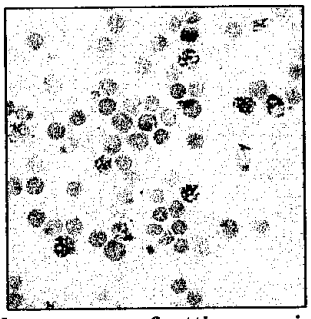


Figure 11 : Réticulocytes mis en évidence sur un frottis sanguin coloré au bleu de Crésyl brillant
(Laboratoire d'Immunologie et Hématologie, ENVL)

3.2.Production réticulocytaire

La production réticulocytaire résulte de l'**hypoxie** engendrée par l'anémie, qui stimule la production d'érythropoïétine au niveau rénal, cette glycoprotéine étant un facteur de croissance pour la lignée érythroïde (*Cowgill 2003*).

Il y a un **temps de latence** d'environ **2 à 4 jours** avant que les réticulocytes ne soient relâchés dans la circulation suite à la stimulation de la moelle osseuse. Toutefois, lors d'anémie hémolytique très sévère, comme par exemple lors d'hémolyse intra vasculaire très intense, la réticulocytose peut apparaître 1 à 2 jours après le début de l'affection (*Fernandez 2000*). Le pic de la réponse réticulocytaire survient 4 à 7 jours après la stimulation initiale et peut retourner à la normale après 15 jours même si l'anémie n'est pas complètement résolue. Une anémie peut donc éventuellement apparaître arégénérative si le pic réticulocytaire a déjà eu lieu. Par ailleurs, lorsque l'hématocrite atteint 30 à 35 %, la moelle osseuse peut simplement répondre à cette anémie faible en relâchant dans le sang périphérique un plus grand nombre d'érythrocytes matures et non des réticulocytes. L'hypoxie est, en effet, insuffisante à ce stade pour stimuler une production d'érythropoïétine supplémentaire (*Cowgill 2003*).

Remarque : Le caractère régénératif peut aussi être mis en évidence par la présence d'érythrocytes nucléés, aussi appelés **érythroblastes**, qui sont normalement présents en très faible quantité chez les animaux sains (moins de 1 pour 100 globules blancs). Leur présence en grand nombre indique une érythropoïèse accélérée (ils se transforment en érythrocytes matures en 24 à 48 heures dans le circulation ou dans la rate), mais également une anomalie au niveau de la barrière entre la moelle osseuse et le sang et dans ce cas la réponse est arégénérative (*Giger 2005*).

3.3.Valeurs

Il y a classiquement, chez les **chiens sains**, un **taux de réticulocytes circulants normal** en dehors de toute stimulation, évalué à moins de 60 000 réticulocytes/mL (pour certains auteurs cela peut aller jusqu'à 80 000) dans le sang périphérique.

- Lors d'anémie, celle-ci sera donc qualifiée de **régénérative** s'il y a **plus de 60 000 réticulocytes/mL** dans le sang circulant.
- **En dessous** de **60 000/mL**, l'anémie est **strictement arégénérative**.
- La réticulocytose est **faible** s'il y a **entre 60 000 et 150 000** réticulocytes/mL dans le sang circulant, **modérée** entre **150 000 et 300 000/mL** et **forte** au dessus de **500 000/mL** (*Cowgill 2003*).

Le **comptage réticulocytaire** (nombre de réticulocytes pour 100 hématies) est de **1%** chez un chien sain. Cependant, ce comptage peut être affecté par un effet de dilution lié à l'état anémique (*Giger 2005*) et le relarguage prématuré de précurseurs érythroïdes (avec des temps de maturation augmenté).
Pour pallier ces erreurs, il faut évaluer la réticulocytose en **nombre absolu.** Certains auteurs recommandent de calculer l'index réticulocytaire. L'index de production réticulocytaire (IPR) serait un excellent marqueur de la dynamique de production érythrocytaire puisqu'il est basé sur le degré de l'anémie et le temps de maturation des réticulocytes dans la circulation périphérique.

L'index de production réticulocytaire est calculé comme suit :
IPR = nombre de réticulocytes x Hématocrite du patient/hématocrite normal (45) x 1/temps de maturation réticulocytaire.

Le temps de maturation réticulocytaire varie en fonction de l'hématocrite (*Badylak 1981*)

Hématocrite (en %)	Temps de maturation réticulocytaire (en j)
45	1
35	1.5
25	2
15	2.5

D'autres auteurs proposent également une méthode de calcul simplifiée :
A = (hématocrite du patient/hématocrite normal) x % réticulocytes
Avec hématocrite normal chez le chien = 45 %
IPR=A/2 si présence de polychromatophilie (correction pour le temps de maturation dans le temps)
IPR = A si pas de polychromatophilie
Si IPR> 2,5 % réticulocytes, l'anémie est régénérative (*Savary-Bataille 2002*).

Un IPR de 2,5 indique une réponse médullaire adéquate, alors qu'un IPR inférieur à 1 indique un déficit médullaire important. Si l'IPR continue à être supérieur à 2 alors qu'il y a une augmentation ou une stabilisation de l'hématocrite, cela indique que l'anémie hémolytique est compensée mais qu'elle se poursuit (*Switzer 1981*). Un IPR supérieur ou égal à 3 suggère fortement un processus hémolytique (*Badylak 1981*).

3.4.Réticulocytose lors d'AHMI

a. Données bibliographiques

Les **AHMI** du chien sont le plus souvent **régénératives** mais le pourcentage de réticulocytes lors d'AHMI est variable (*Liesveld 1987*).

La majorité des chiens présentent une **réticulocytose modérée à sévère** au moment du diagnostic. Cela concerne **38 %** (*Klag 1993*) à **71%** des chiens (*Weinkle 2005*).

Cependant, un nombre non négligeable de chiens présente une **réticulocytose absente à faible** à l'admission : de **15 %** (*Day 1996*), **28 %** (*Mason 2003*), **29 %** (*Klag 1993*) à **37%** (*Bennett 1981*), ce qui ne doit donc pas faire écarter le diagnostic d'AHMI. Dans certaines études, cette seconde catégorie est même majoritaire : 58% des chiens dans l'étude de Burgess et *al.* (*Burgess 2000*).

Dans la majorité des cas, l'AHMI devient régénérative au cours de l'évolution si elle ne l'est pas au départ. Cependant, certaines formes d'AHMI demeurent arégénératives (*Scott-Moncrieff 1995*).

b. Absence de réticulocytose

Une absence de réticulocytose face au développement d'une AHMI peut s'expliquer par plusieurs mécanismes :

- Il existe un **temps de latence** physiologique de 4 à 5 jours avant que la moelle osseuse ne produise des réticulocytes suite à une hémolyse aiguë (classes I et II en particulier). Ce délai est théorique et il peut y avoir un retard de la réponse médullaire au stress hémolytique (*Jones 1991*) Ainsi, environ un tiers des animaux avec une

AHMI ont une anémie arégénérative lors de la première analyse, car souvent la réponse médullaire n'a pas encore eu le temps de se mettre en place (*Giger 2005, Klag 1993*) ;

- Une **réaction à médiation immune** peut inhiber la réponse réticulocytaire : on parle alors d'anémie immunologique arégénérative ;

- Il peut exister une **affection médullaire sous-jacente** (*Barker 2000, Klag 1993*), notamment infectieuse qui compromet l'érythropoïèse (*Weinkle 2005, Stokol 2000*). Cela peut également résulter d'une affection inflitrative médullaire;

- Le processus en cours lors d'AHMI peut modifier le **micro-environnement** de la moelle osseuse et donc perturber l'érythropoïèse (*Giger 2005*) ;

- Il a aussi été suggéré que la quantité de **fer** disponible pouvait être un facteur limitant la réponse médullaire à l'hémolyse (*Jones 1991, Klag 1993*).

Par ailleurs, les données biologiques relatives à l'érythropoïèse canine sont souvent extrapolées à partir de ce que l'on connaît en médecine humaine. Le nombre de réticulocytes dans la circulation périphérique reflète de façon peu précise l'activité érythropoïétique, en supposant qu'il y ait une libération médullaire normale des réticulocytes et que ceux-ci persistent dans la circulation pendant un temps normal. Par ailleurs, une activité hématopoïétique dans la rate (hématopoïèse extra médullaire) (*Badylak 1981*) et une rétention de GR immatures dans celle-ci a été notée chez des chiens atteints d'anémie hémolytique.

Remarque : Il semble que les chiens atteints d'une AHMI avec une réticulocytose forte à l'admission aient un taux de survie meilleur que ceux qui présentent une réticulocytose faible ou absente.

4. Modifications de la lignée blanche

4.1.Données de l'hémogramme

Les chiens avec une AHMI présentent classiquement une **leucocytose neutrophilique** (*Thébault 2005*) modérée à marquée, ainsi qu'un **déplacement à gauche** de la **courbe d'Arneth** (augmentation du nombre de granulocytes immatures) (*McCullough 2003, Stewart 1993b*). Dans les différentes études, le nombre de chiens atteints d'AHMI présentant une leucocytose est variable mais est le plus souvent élevé : **plus de 60 %** des chiens (*Bennett 1981, Mason 2003, Burgess 2000, Day 1996*).

Des **modifications toxiques** des neutrophiles peuvent également être présentes (*McManus 2001*). Ceci se traduit par des anomalies dans la taille des cellules, la forme, la consistance et le contenu cytoplasmique. Ces modifications peuvent être mises en évidence à l'examen d'un frottis sanguin coloré par une coloration Romanowsky (*Aroch 2005*).

Une **monocytose modérée** peut également être observée (*Switzer 1981*).

Dans de très rares cas, une **leucopénie** est, au contraire, rapportée. Une étude réalisée à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort rapporte ainsi 34,4% de cas avec une leucopénie parmi les 35 chiens présentant une AHAI (*Person 1988*).

Remarque : Si une agglutination ou des érythroblastes sont présents, cela peut majorer la numération leucocytaire car des hématies nucléées ou des doublets de GR sont suceptibles d'être comptés comme des leucocytes (*Thrall 2004*) d'où l'importance de vérifier la numération blanche par un comptage manuel sur le frottis sanguin.

4.2. Origine des modifications

a. Leucocytose

i. Nécrose tissulaire

L'équipe de McManus (*McManus 2001*) a étudié la corrélation entre la leucocytose et les lésions nécropsiques chez 34 chiens avec une AHMI. La **nécrose tissulaire**, secondaire à l'hypoxie anémique ou à une affection thromboembolique, serait le principal stimulus de cette leucocytose. La nécrose quelle que soit son origine est, en effet, une cause de leucocytose, souvent sévère (supérieure à 50 000/µL) (*Lucroy 1999*). Lors d'AHMI, une des principales lésions de nécrose est une **nécrose hépatique centrolobulaire**. Bien que **l'hypoxie anémique** soit le mécanisme sous-jacent le plus probable de cette nécrose centrolobulaire, aucune corrélation n'a pu être détectée entre la sévérité de l'anémie et la sévérité des lésions post-mortem. La durée de l'hypoxie anémique pourrait aggraver les lésions. Les capacités de compensation de l'organisme et donc d'apport de l'oxygène à tous les tissus via un ajustement des fonctions cardio-vasculaires lorsque l'hématocrite diminue sont dépassées chez l'homme quand l'hématocrite est inférieur à 22,5%. La réponse physiologique à une hémodilution serait similaire chez le chien et on peut donc penser que le même seuil critique s'applique. Or, de nombreux chiens avec une AHMI ont un hématocrite inférieur à 20% et ne sont donc pas capables de compenser et entrent, par conséquent, dans un état d'hypoxie anémique sévère. Des lésions d'infarctus, de un ou plusieurs organes, secondaires à une **affection thromboembolique** (infarctus pulmonaire, splénique, rénal ou cardiaque) seraient également présentes lors d'AHMI.

Le mécanisme responsable de la leucocytose qui se met en place secondairement à une nécrose n'est pas bien connu mais la neutrophilie reflète potentiellement un changement dans la cinétique granulocytaire à trois niveaux : la moelle osseuse, le sang et les tissus. Ces changements incluent une augmentation du taux de prolifération médullaire, de la libération médullaire et du pool de granulocytes circulants, et une diminution du taux de migration du sang vers les tissus. Les cytokines libérées suite à une nécrose, mais aussi suite à une infection et une néoplasie, joueraient un rôle majeur dans l'apparition de cette leucocytose (*McManus 2001*, *Day 2000*).

ii. Rôle des corticostéroïdes

Les corticostéroïdes peuvent influencer la concentration leucocytaire. Dans ce cadre, la leucocytose serait principalement due à une démargination du pool circulant avec une participation minoritaire de la libération médullaire ou de la diminution de migration tissulaire. Par ailleurs, la leucocytose engendrée par les corticoïdes n'est pas soutenue et comme, chez le chien, les leucocytes marginés représentent environ la moitié des leucocytes intra vasculaires totaux, l'augmentation serait limitée à un doublement de la numération leucocytaire (*McManus 2001*).

iii. Rôle des composants du complément

Les facteurs C3a et C5a pourraient également stimuler la libération médullaire des neutrophiles et amplifier l'effet des corticostéroïdes (*McManus 2001*, *Honeckman 1996*).

iv. Diminution de la migration tissulaire leucocytaire

Une diminution de la migration tissulaire des leucocytes pourrait aussi expliquer cette leucocytose. Cette diminution peut être attribuée à une incapacité des leucocytes à adhérer à l'endothélium, à une diminution de la migration tissulaire suite à une résolution de l'inflammation et donc une diminution des besoins tissulaires. La mauvaise perfusion des tissus nécrotiques pourrait également inhiber cette migration : lors de l'examen nécropsique, les régions tissulaires nécrosées sont, en effet, pauvres en neutrophiles (*McManus 2001*).

v. Stimulation de la moelle osseuse

La leucocytose peut faire suite à une réponse non spécifique de la moelle osseuse à l'anémie : réaction leucoérythroblastique (*Lewis 1989*).

Il semble donc que la leucocytose observée lors d'AHMI soit d'origine multifactorielle. La combinaison d'une hyperplasie myéloïde stimulée par les cytokines, d'une libération médullaire augmentée, d'une démargination neutrophilique et d'une diminution de la migration dans des tissus nécrosés mal perfusés y contribuent (*McManus 2001*). La leucocytose n'est généralement pas rencontrée dans les autres formes d'anémie (*Giger 2005*). Toutefois, lors de leucocytose importante, une infection concomitante à l'AHMI ne peut être écartée d'emblée.
Les leucocytoses sévères sont associées à des survies faibles chez les patients atteints d'AHMI (*McCullough 2003*).

b. Leucopénie

Certains auteurs rapportent également la survenue, dans quelques cas, d'une leucopénie, qui pourrait résulter d'une neutropénie à médiation immune, d'une infection concomitante ou d'une diminution de production médullaire (atteinte médullaire, éventuellement auto-immune) *(Miller 2003, Person 1988).*

5. Plaquettes

5.1. Données de l'hémogramme

Le nombre de chiens atteints d'AHMI et présentant une thrombopénie est variable : de **28 %** (*Day 1996*), **37 %** (*Bennett 1981*), **44%** (*Mason 2003*), **65 %** (*Scott-Moncrieff 2001*), **67 %** (*Klag 1993*), **68 %** (*Burgess 2000*) à **70 %** (*Carr 2002, Miller 2003).*

5.2. Origine de la thrombopénie

Plusieurs causes peuvent expliquer la thrombopénie rencontrée lors d'AHMI :

- **Thrombopénie à médiation immune**

L'association d'une thrombopénie à médiation immune et d'une AHMI est fréquemment rapportée et décrite sous le nom de syndrome d'Evans.

- **CIVD**

La thrombopénie peut résulter d'un excès de consommation lors de CIVD (*Cotter 1992, Miller 2003).*

- **Sepsis**

La thrombopénie peut également résulter d'un excès de consommation lors de sepsis *(Miller*

2003).

- **Cytokines inflammatoires**

Les cytokines inflammatoires ont un effet prothrombotique, d'où une consommation excessive de plaquettes (*Thébault 2005*).

- **Séquestration splénique**

Une séquestration splénique des thrombocytes pourraient également contribuer à la thrombopénie (*Weinkle 2005*).

- **Défaut de production médullaire**

Un défaut de production médullaire plaquettaire (toxicose à médiation immune ou médicamenteuse) peut être impliquée (*Weinkle 2005*).

6. Bilan des données de l'hémogramme

L'hémogramme peut aider à identifier la classe de l'AHMI en cause (*Stewart 1993b*) :

- **Anémie immunologique hémolytique**
  - **AHMI suraiguë** (classe I et II) : anémie marquée, hémolyse modérée, quelques sphérocytes ;
  - **AHMI aiguë** : anémie régénérative, leucocytose neutrophilique avec déviation à gauche de la courbe d'Arneth, sphérocytes plus nombreux ;
  - **AHMI chronique** (classes III à V) : réponse régénérative et sphérocytose importante.
- **Anémie immunologique centrale** : anémie sévère arégénérative, peu ou pas de sphérocytose (*Jonas 1987, Scott-Moncrieff 1995*), leucocytes dans les valeurs usuelles ou légèrement augmentés (*Jonas 1987*), rarement, pancytopénie (*Stokol 2000*).

B. Paramètres biochimiques

1. Rappel sur la dégradation des globules rouges, hémolyse intra et extravasculaire

L'**hémoglobine** est une hétéroprotéine qui est composée de l'**hème** et d'une glycoprotéine, la **globine**. Chaque globine s'unit avec un hème et forme un monomère, 4 monomères s'unissent pour former l'hémoglobine qui est donc tétramérique. L'hémoglobine constitue 95 à 98% du poids sec des hématies.

Ainsi la dégradation de l'hémoglobine donne la globine et l'hème. Cette dernière est un noyau tétrapyrolique, qui donne par scission un **noyau ferrique** contenant principalement de l'hémosidérine (forme de stockage du fer) et un autre noyau coloré donnant principalement de la **bilirubine** (*Lewis 1989*).

1.1.Hémolyse extravasculaire

Le système de l'hème oxygénase responsable de la dégradation de l'hémoglobine est situé principalement dans les phagocytes (*Giger 2005*). La **globine** est décomposée en acides aminés qui sont ré-utilisés. Lors du catabolisme de l'**hème**, le **fer** est libéré, recircule lié à la transferrine du plasma vers la moelle osseuse pour participer à l'érythropoïèse. Du monoxyde carbone se sépare et est libéré, la **biliverdine** se forme et est alors réduite en **bilirubine** (*Giger 2005*).

La **bilirubine** est ensuite excrétée dans le plasma, sous une forme très peu soluble dans l'eau, liée à l'albumine de façon étroite et réversible, ce qui interdit le passage rénal ; elle est dite " **libre** " ou " **non conjuguée** " ou " **indirecte** ". La bilirubine liée à l'albumine est rapidement captée par les hépatocytes. Dans le foie, la bilirubine subit une glycuro-conjugaison.

La **bilirubine conjuguée**, hydrosoluble, est excrétée via les **voies biliaires** dans le **duodénum**, mais en présence d'une hémolyse extravasculaire trop intense (ictère par rétention), la bilirubine conjuguée reflue également dans le plasma et est excrétée dans l'urine. Ainsi, la bilirubine conjuguée est normalement absente du sang sauf si un ictère par rétention est présent. Dans la lumière intestinale, la bilirubine est transformée en **urobilinogènes** par les bactéries du colon dont 20 % sont oxydés en urobiline et absorbés dans le sang pour être éliminés par les urines ou les voies biliaires (cycle entéro-hépatique); les 80 % restant vont se transformer en **sterco-bilinogènes**, oxydables en stercobiline jaune orangé qui colore les matières fécales.

Ainsi, la **concentration sérique en bilirubine** est un important marqueur du métabolisme de l'hémoglobine et de la fonction hépatobiliaire. Lors de mesure colorimétrique, les valeurs normales de bilirubinémie ne doivent pas excéder 0,4 mg/dL, et l'ictère apparaît au niveau des muqueuses quand la concentration sérique excède 2 mg/dL, la peau devenant ictérique pour des concentrations plus élevées (*Giger 2005*). En théorie, lors d'une affection hémolytique, on a une augmentation de la bilirubine non conjuguée alors que lorsqu'il s'agit d'un dysfonctionnement hépatique, on a une augmentation de la bilirubine conjuguée. En pratique, cette dichotomie n'est pas aussi simple.

L'hème peut être métabolisé par des voies alternatives dans d'autres tissus, notamment les reins chez le chien. Une augmentation de la dégradation de l'hème résulte donc toujours en une hyperbilirubinurie parce qu'il y a une augmentation de l'excrétion urinaire de la bilirubine conjuguée.

1.2.Hémolyse intra vasculaire

L'hémoglobine est directement libérée dans le sang duquel elle est retirée par différents mécanismes.

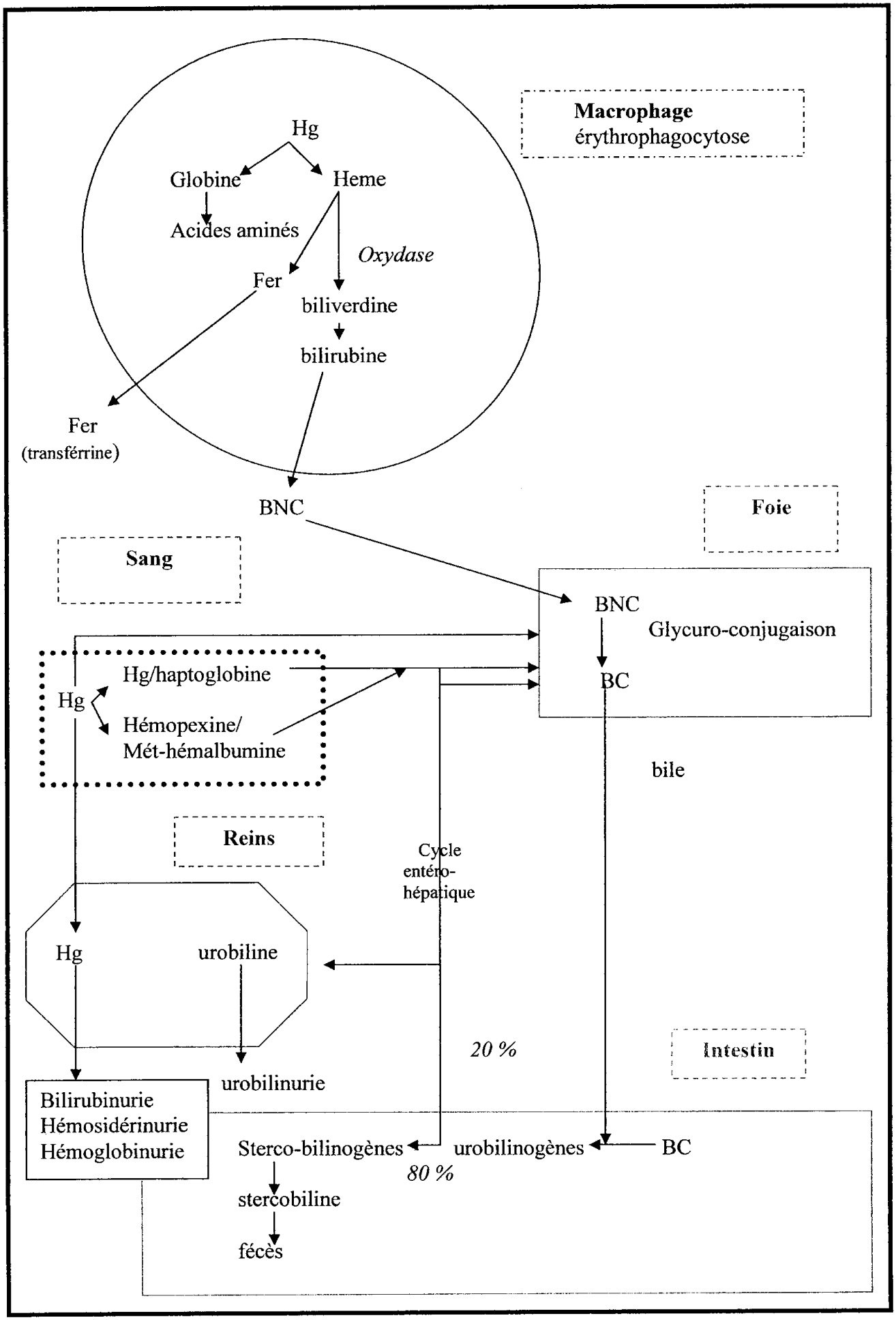
- L'hémoglobine est liée à l'**haptoglobine** (α2 globuline plasmatique) dans un complexe stable et soluble, mais non filtrable par le glomérule rénal. Ces complexes sont déposés dans les hépatocytes, et présentent une demi-vie inférieure à 10 minutes. L'hémoglobine est ensuite métabolisée par voie enzymatique en bilirubine (même mécanisme que pour une hémolyse extravasculaire) et l'haptoglobine est libérée après environ 3 jours. La formation de ce complexe et son élimination extrêmement rapide du plasma empêchent ainsi qu'une hémoglobinurie se produise avec une perte importante de fer. Une réduction du taux d'haptoglobine libre indique une hémolyse vasculaire (*Badylak 1981*).

- Une faible partie de l'hémoglobine plasmatique est rapidement transformée en **méthémoglobine** qui perd son hème à Fe^{+++} donnant l'**hématine**, celle-ci se fixe à :
  - l'**hémopexine**, rapidement éliminée par l'hépatocyte et la bile ;
  - l'**albumine,** ce qui forme la **méthémalbumine**, sorte de réserve plasmatique de l'hématine, car éliminable seulement après retour de l'hème sur l'hémopexine.

- Quand ces systèmes sont débordés, l'hémoglobine libre gagne pour moitié le **système macrophagique** du **foie**, comme ci-dessus mais peut aussi franchir le glomérule rénal : elle sera réabsorbée par le tubule proximal et catabolisée en **bilirubine** par le **rein**, qui élabore les enzymes nécessaires ; le fer est stocké sous forme d'hémosidérine qui est libérée plus tard (hémosidérinurie qui va permettre un diagnostic rétrospectif d'hémolyse intra vasculaire). La mise en évidence de fer dans le culot urinaire via une coloration au bleu de prusse indique donc un processus hémolytique (*Badylak 1981*). L'**hémoglobinurie** survient quand les quantités filtrées dépassent les capacités de réabsorption tubulaire. Bien que les pigments de l'hème puissent précipiter et former des « moules » dans les tubules rénaux distaux, la **nécrose tubulaire hémosidérinurique** et l'**insuffisance rénale aigue** qu'ils pourraient entraïner sont rarement observées chez les carnivores domestiques lors d'hémoglobinurie sévère ou chronique.

L'hémolyse intra vasculaire peut être rapidement reconnue par la présence d'une **hémoglobinémie**, la **diminution** de la **concentration plasmatique en haptoglobine** et une **hémoglobinurie**. Si la concentration plasmatique en hémoglobine est de 10 à 20 mg/dL, le plasma prend une coloration ambrée, et si elle est de 50 à 100 mg/dL, il est rougeâtre (*Giger 2005*).

Figure 12 : Représentation schématique de la dégradation de l'hémoglobine



2. Paramètres rénaux

Lors d'AHMI, on observe une **azotémie** :

- Dans la majorité des cas, l'azotémie est **pré-rénale** et résulte de la déshydratation ;
- Dans quelques cas, cependant, l'azotémie est **rénale**. Elle est alors la conséquence d'une ischémie rénale liée à l'hypoxie anémique, de lésions rénales directes provoquées par la cristallisation dans les tubules de l'hémoglobine libre (néphropathie hémoglobinurique) (*Stewart 1993b*), d'une CIVD ou d'un sepsis *(Miller 2003)*.

3. Paramètres hépatiques

Lors d'AHMI, on note une élévation plus ou moins importante des enzymes hépatiques : alanine aminotransférase (AlAT), phosphatases alcalines (PAl) et gammaglutamyl transférase (GGT) (*Stewart 1993b*). Une élévation faible à modérée de la concentration en transaminases hépatiques peut être attribuée à l'**hypoxie hépatocytaire**. Les PAl peuvent être augmentées à cause d'une **cholestase** liée à l'hyperplasie du système des phagocytes mononucléés ou à une hématopoïèse extra médullaire à l'intérieur du foie *(Miller 2003)*. L'**inflammation** et la **nécrose** hépatique jouent également un rôle (*Giger 2005*).

4. Produits de dégradation de l'hémoglobine

4.1.Bilirubinémie

Le taux de bilirubine sanguin est augmenté dans **20 à 75 %** *(Miller 2003, Cotter 1992)* des cas d'AHMI, en liaison avec l'intensité de l'hémolyse et sa vitesse d'installation (*Thébault 2005*). La bilirubinémie lors d'AHMI est variable (*Burgess 2000, Klag 1993*). Dans les cas chroniques, la concentration sérique en bilirubine peut être normale ou seulement légèrement augmentée, probablement à cause de la haute efficacité du métabolisme de la bilirubine. Au contraire, lors d'hémolyse brutale et intense, la bilirubinémie est, en général, élevée (*Giger 2005*).

La bilirubinémie est attribuée à une augmentation de la libération hépatique suite à l'**hémolyse** et une **diminution** de la **clairance hépatique** (*Stewart 1993b*). Il existerait une corrélation entre la bilirubinémie et l'activité de la phosphatase alcaline (*Carr 2002*). Par ailleurs, une augmentation de la concentration sérique en bilirubine peut aussi indiquer une **hépatopathie** concomitante ou sous-jacente aggravée par l'AHMI (*Giger 2005*, *Klag 1993*). L'hyperbilirubinémie lors d'AHMI peut ainsi résulter de causes hémolytiques ou hépatobiliaires. Les altérations des mécanismes hépatobiliaires lors d'AHMI qui conduisent à une hyperbilirubinémie incluent une nécrose hépatocellulaire secondaire à l'hypoxie, une thromboembolie, une ischémie et des lésions de l'endothélium hépatique induites par l'hémoglobine (*Weinkle 2005*).

Plusieurs études rapportent qu'une hyperbilirubinémie élevée est un **facteur pronostic péjoratif** (*McManus 2001*, *Carr 2002*).

L'augmentation de la mortalité rapportée lors d'hyperbilirubinémie peut s'expliquer par le fait qu'une hyperbilirubinémie marquée accompagne en général un taux d'hémolyse élevé et donc la présence d'une AHMI sévère. Par ailleurs, l'hyperbilirubinémie peut être associée à une affection hépatique concomitante, ou une perte importante des fonctions hépatiques secondaire aux lésions ischémiques, le foie n'étant alors plus capable d'assurer la

clairance de la bilirubine produite en excès. Une majoration importante de la bilirubinémie pourrait aussi être liée à la présence de thrombi dans le foie comme en atteste une étude de Carr même s'il n'existe pas de corrélation significative entre les deux (*Carr 2002*).

4.2.Modifications lors d'hémolyse intra vasculaire

Lors d'hémolyse intra vasculaire, on peut observer
- une hémoglobinémie. L'hémoglobinémie est retrouvée de façon inconstante lors d'AHMI, dans environ 10 % des cas (*Klag 1993*), l'hémolyse intra vasculaire étant rare.
- une **méthémoglobinémie** et une **méthémalbuminémie,**
- une **hyperbilirubinémie**,
- une **diminution** de la **concentration sérique** en **hémopexine** et en **haptoglobine**. Lorsque la concentration en haptoglobine libre diminue cela peut indiquer une hémolyse intra vasculaire car elle se combine alors avec l'hémoglobine libre, toutefois la concentration en haptoglobine peut être normale voire même augmentée lors d'hémolyse intra vasculaire (*Jones 1991*).

Par ailleurs, l'hémolyse intra vasculaire peut survenir seulement de façon transitoire, et donc l'hémoglobinémie et l'hémoglobinurie survenant alors ponctuellement et passant inaperçues (*Giger 2005*).

5.Autres paramètres biochimiques

D'autres modifications des paramètres biologiques peuvent être occasionnellement observées lors d'AHMI :

- Une **diminution** du **fer sérique** serait observée dans 50 % des cas (*Fournel 1994*).

- Une **acidose lactique** due à l'hypoxie tissulaire peut également survenir *(Miller 2003)*.

- Une **hyperglobulinémie** est occasionnellement notée et fait suite à une réponse inflammatoire importante *(Miller 2003)*.

- Une **augmentation** des **créatine kinases** peut être observée : l'augmentation peut refléter l'influence combinée de l'hypoxie, du décubitus, de l'altération de la perméabilité des membranes cellulaires, des lésions musculaires consécutives à l'hypoperfusion, des complications thromboemboliques (incluant une myopathie embolique), de poses répétées de cathéters et des injections médicamenteuses sous-cutanées ou intramusculaires (*Weinkle 2005*).

- Une **hypokaliémie** peut survenir : cela peut promouvoir la vasoconstriction et peut augmenter le risque de complications vasculaires et thromboemboliques (*Weinkle 2005*).

- Une **hypoalbuminémie** est fréquemment rencontrée. Lors d'AHMI, il existe de nombreuses causes expliquant cette hypoalbuminémie. Elle peut résulter d'une diminution de synthèse faisant suite à une régulation négative par certaines cytokines inflammatoires et/ou une atteinte hépatique ; une fuite protéique peut également être en cause (*Weinkle 2005, Carr 2002*). L'hypoalbuminémie prédispose à la

thromboembolie et est donc associée à un risque accru de mortalité. Chez les hommes atteints d'AHMI, c'est aussi un facteur pronostique négatif mais on ne sait pas si elle a un rôle physiopathologique spécifique.

6.Analyse d'urines

6.1.Hémoglobinurie

Lors d'AHMI, une hémoglobinurie peut être présente s'il y a une hémolyse intra vasculaire suffisante pour saturer les transporteurs de l'hémoglobine libre et la capacité de réabsorption du tube contourné proximal (*Stewart 1993b*). L'hémoglobinurie apparaît si la concentration en hémoglobine libre excède **1,5 g/L** (*Gaillot 1998*).
Toutefois, l'hémolyse intra vasculaire étant rare lors d'AHMI, l'hémoglobinurie est retrouvée de façon inconstante, chez environ 10 % (*Klag 1993*) à 30 % des chiens (*Bennett 1981*).

6.2.Hémosidérinurie

Dans les affections hémolytiques chroniques, l'hémosidérose de l'épithélium tubulaire rénale et par conséquent la transformation des cellules épithéliales peut se traduire par la présence d'hémosidérine dans les urines.

6.3.Bilirubinurie

Une bilirubinurie marquée serait retrouvée chez tous les chiens atteints d'AHMI, que l'hémolyse soit intra ou extra vasculaire (*Fournel 1994, Klag 1993*).

6.4.Urobilinurie

Une urobilinurie est occasionnellement rencontrée.

IV. Lésions

A l'échelle tissulaire, l'anémie est à l'origine, de façon directe, de lésions de **nécrose hépatique centrolobulaire, d'hépatite chronique** et **d'hyperplasie des canaux biliaires**. Si la première lésion est quasi systématique, les deux dernières sont plus ou moins marquées selon l'intensité et la durée de l'hypoxie tissulaire. D'autres organes (rate, reins, intestins, coeur et poumons) sont également atteints par des lésions nécrotiques liées à l'hypoxie et à des infarcti secondaires à des thromboembolies (*McManus 2001, Thébault 2005*). Ainsi, lors de l'examen histologique, des cas de glomérulonéphrite et de myocardite sont également observés (*Switzer 1981*).

Les lésions microscopiques sont corrélées aux découvertes macroscopiques.

- Lors d'hémolyse intra vasculaire sévère, on observe une **néphropathie hémoglobinurique**, une **lipidose hépatique** avec une vacuolisation centrolobulaire des hépatocytes, une **hématopoïèse extra médullaire**, et d'autres changements secondaires associés à l'anémie sévère.
- Les lésions prédominantes associées à l'hémolyse extravasculaire concernent principalement le **système réticuloendothélial**, ce qui inclus les macrophages des nœuds lymphatiques (NL) et de la rate, les cellules de Küpffer hépatiques et les macrophages

alvéolaires. Les changements du système réticuloendothélial comprennent des images d'hyperplasie, d'hémosidérose et d'érythrophagocytose. En particulier, microscopiquement, sont mises en évidence : une **hyperplasie des cellules réticuloendothélial** dans la **pulpe rouge** de la **rate**, une hyperplasie des **cellules de Küpffer** dans le foie, une hyperplasie réactive et marquée des histiocytes des **NL**, une **hémosidérose** dans le foie, la rate, la moelle osseuse et les macrophages alvéolaires, et une **érythrophagocytose** marquée dans les NL et la rate. D'autres changements associés à l'anémie sévère incluent une **hyperplasie myéloïde et érythroïde** de la moelle osseuse et une **hématopoïèse extra médullaire.**

Même si ces lésions ne sont pas pathognomoniques d'une AHMI, la découverte de leur combinaison est généralement compatible avec une affection hémolytique intra vasculaire ou extravasculaire sévère (*Lewis 1989*).

V. Pronostic

De nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer s'il existait des **facteurs pronostiques** lors d'AHMI. Il n'existe actuellement aucun consensus concernant ces facteurs puisque les résultats des différentes études sont souvent contradictoires.

A. Paramètres épidémiologiques

Pour plusieurs auteurs, les critères épidémiologiques auraient une **faible incidence** sur la survie lors d'AHMI. Ainsi, certaines études ont montré que la **race** *(Weinkle 2005),* l'**âge**, le **sexe** (*Grundy 2001*) ou encore la **saison** (*Klag 1992*) n'étaient pas significativement associés à une diminution de la survie. Toutefois, Weinkle a montré que les animaux âgés présentaient un taux de mortalité accru lors d'AHMI par rapport aux animaux plus jeunes (*Weinkle 2005*).

B. Paramètres hématologiques

Plusieurs études ont mis en évidence qu'un **hématocrite faible** à l'admission était significativement associé à des taux de survie plus faible (*Klag 1993*), en particulier si cet hématocrite était inférieur à 10 % (*Switzer 1981*). Pour d'autres auteurs, au contraire, l'intensité de l'anémie à l'admission aurait peu d'influence sur la survie (*Burgess 2000, Grundy 2001, Weinkle 2005*).

De la même façon, alors que pour certains, une **réticulocytose faible** à l'admission serait un facteur pronostique péjoratif (*Klag 1993, Switzer 1981*), pour d'autres, cela ne serait pas confirmé (*Burgess 2000, Weinkle 2005*).

La **sphérocytose** ne semble pas avoir d'incidence pronostique (*Weinkle 2005*).

Les études semblent s'accorder sur le fait qu'une **thrombopénie marquée** est associée à une diminution du taux de survie (*Carr 2002, Weinkle 2005*).

Une **leucocytose majeure** (*Burgess 2000*), une **déviation à gauche** de la **courbe d'Arneth** (*McManus 2001*) et une **neutrophilie** (*Weinkle 2005*) semblent aggraver le pronostic.

Des **anomalies des paramètres de l'hémostase** assombriraient le pronostic (*Burgess 2000, Weinkle 2005*).

Enfin, concernant l'**auto agglutination**, il semble, dans la majorité des publications, qu'elle n'ait pas d'influence significative (*Grundy 2001, Klag 1992, Weinkle 2005*) même si pour Duval, elle serait significativement associée à une diminution de la survie (*Duval 1996*).

C. Paramètres biochimiques

Les études s'accordent sur le fait qu'une **augmentation des PAI** est un facteur pronostic péjoratif (*Carr 2002, Reimer 1999*) alors que l'**augmentation des AlAT** n'a pas d'influence sur la survie (*Reimer 1999, Weinkle 2005*).

En ce qui concerne l'**hyperbilirubinémie**, la majorité des études mettent en évidence une augmentation du taux de mortalité lors celle-ci est présente (*Klein 1989, McManus 2001, Reimer 1999*). Toutefois, le seuil à partir duquel cette hyperbilirubinémie est significativement associée à une diminution de la survie varie de 1,5 mg/dL (*Weinkle 2005*) à 5 mg/dL (*Carr 2002*) ou 10 mg/dL (*Klag 1993*). Burgess, quand à lui, n'a pas montré d'influence de l'hyperbilirubinémie sur la survie (*Burgess 2000*).

Enfin, de faibles concentrations sériques en **protéines totales**, **albumine** (*Carr 2002*), **potassium** ou **bicarbonates** (*Weinkle 2005*) diminueraient le taux de survie, de même qu'une concentration sérique élevée en **créatines kinases** (*Weinkle 2005*).

D. Paramètres cliniques

Une **tachypnée** supérieure à 60 mouvements par minute serait un facteur pronostique négatif puisque cela serait en faveur d'une potentielle thromboembolie (*Weinkle 2005*). La **fréquence cardiaque**, la **température rectale** et le **poids** à l'admission ne semblent, par contre, pas avoir d'influence (*Weinkle 2005*).

E. Affections concomitantes

Une **atteinte rénale, hépatique ou cardiaque** concomitante assombrit le pronostic, de même que l'association de l'AHMI à une **autre affection immunologique** (*Switzer 1981*).

Chapitre III : Diagnostic

I. Démarche générale

Le diagnostic des anémies immunologiques s'inscrit dans le schéma général du diagnostic des anémies, dont les **trois étapes fondamentales** sont : confirmer l'anémie, en évaluer la gravité, et la caractériser, c'est-à-dire en rechercher l'origine.

A. Première étape

Dans un premier temps, une fois l'anémie confirmée (diminution du taux d'hémoglobine circulante), il faut déterminer sa sévérité et la caractériser grâce aux index érythrocytaires. Enfin, il est utile d'évaluer le caractère régénératif de l'anémie par un comptage réticulocytaire.

B. Deuxième étape

Il faut ensuite confirmer l'origine immunologique de l'anémie. Le diagnostic d'AHMI repose sur le triptyque **anémie**, signes d'**hémolyse** et présence démontrée **d'un revêtement anticorps** à la surface des érythrocytes. Les signes d'hémolyse ne sont pas retrouvés pour les formes centrales, sauf si elles sont associées à une atteinte périphérique et ils peuvent être très discrets dans certaines formes d'AHMI, en particulier chroniques.

C. Troisième étape

Enfin, il faut déterminer l'origine de l'anémie immunologique. Pour qualifier une anémie immunologique d'idiopathique, on réalise une démarche d'exclusion des principales causes connues comme étant associées à ce type d'anémie. Ainsi, la détermination du caractère primaire ou secondaire de l'affection et l'identification d'une cause sous-jacente s'appuie sur :

- Une **anamnèse** détaillée (vaccination récente, prise de médicament, séjour en zone d'endémie de maladies rickettsiennes, antécédents vaccinaux...).
- Des **critères épidémiologiques.**
- Des **critères cliniques**, qui guident la réalisation d'examens complémentaires appropriés.
- Des **examens complémentaires** : hémogramme complet, paramètres biochimiques, analyse d'urines, bilan de coagulation, imagerie, sérologies, PCR et éventuellement cultures sanguines (*Scott 2000*). Tous ces examens complémentaires ne doivent pas être mis en place d'emblée mais le choix doit être guidé en fonction des éléments anamnestiques et cliniques. Toutefois, de nombreux auteurs reconmmandent de rechercher de façon systématique les principales maladies infectieuses accompagnant les anémies immunologiques : babésiose, leishmaniose et ehrlichioses au sens large principalement (exclusion sérologique à minima lorsque la sérologie est accessible, ou mieux par technique de biologie moléculaire : PCR).

II. Détermination du caractère immunologique de l'anémie

La détermination du caractère immunologique de l'anémie passe par la recherche des anticorps et/ou du C à la surface des érythrocytes (ou plus rarement des précurseurs médullaires érythropoïétiques). On se base principalement sur trois marqueurs : une sphérocytose marquée, une véritable auto-agglutination et la mise en évidence d'un revêtement anticorps sur les hématies notamment grâce au TCD (*Giger 2005*). D'autres méthodes, moins fréquemment utilisées en pratique courante seront également abordées.

A. Auto-agglutination sur lame ou en tube

L'auto-agglutination spontanée révèle la présence anormale d'**anticorps** à la surface des hématies. Elle est provoquée par la présence de faible taux d'IgM ou par des taux élevés d'IgG à la surface des GR (*Cotter 1992, Giger 2005, Poitout 1994-1995*).

Le pourcentage de chiens atteints d'AHMI et présentant une auto-agglutination est variable : de **42 %** (*Carr 2002*) à **78 %** (*Weinkle 2005*). Ce pourcentage serait plus faible lors d'anémie immunologique centrale (*Jonas 1987, Scott-Moncrieff 1995*).

L'auto-agglutination s'observe à l'œil nu ou au microscope sans coloration, et persiste après dilution dans un soluté salé isotonique (*Barker 2000*). L'agglutination peut, ainsi, être observée en tournant légèrement le tube de prélèvement (*Day 2000*). Microscopiquement, les agglutinats sont observés aux marges de la zone d'étalement des GR et de la queue de frottis (*Poitout 1994-1995*).

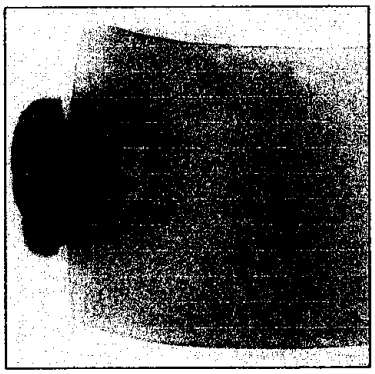


Figure 13 : Agglutination macroscopique

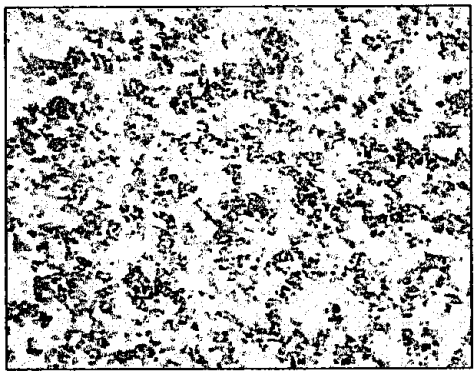


Figure 14 : Agglutination microscopique

(Laboratoire d'Immunologie et Hématologie, ENVL)

Il ne faut pas confondre l'agglutination (GR regroupés en « grappe de raisin ») avec la présence de **« rouleaux » d'hématies** (GR alignés, comme des « rangées de pièces de monnaie »), fréquents lors d'inflammation ou d'hyperprotéinémie (*Gaillot 1998*). Les rouleaux disparaissent spontanément si une goutte de sérum physiologique (NaCl 9‰) est ajoutée sur la lame (dans les proportions 1 goutte de sérum physiologique pour 1 goutte de sang ou 3 :1 voire 5 :1 selon les auteurs) (*Harvey 1980, Thébault 2005, Giger 2005, Cotter 1992, McCullough 2003*). Pour des raisons inexpliquées, les GR du chien ont, par ailleurs, tendance à s'agglutiner de façon non spécifique en présence de plasma, particulièrement à basse température dans l'EDTA (*Giger 2005*). Un refroidissement du prélèvement (à +4°C) peut donc favoriser ou accentuer ce phénomène. Si l'agglutination persiste après un lavage par une solution saline, on parle de « **vraie auto-agglutination** ».

Cette auto-agglutination est principalement due aux anticorps de la classe I *(Miller 2003)*, les auto-agglutinines. Elle se rencontre également lors d'affections médiées par les agglutinines froides (classe IV) et dans ce cas est particulièrement observée lorsque le stockage se fait à 4°C. L'agglutination disparaît à 37°C. Toutefois, pour certains auteurs, des auto agglutinines froides pourraient exister chez des chiens sains mais à des titres faibles (*Day 2000*).

Dans la classe III, qui apparaît comme étant la plus fréquente chez le chien, les anticorps sont dits « incomplets » et ne sont pas capables, seuls, de provoquer une auto-agglutination, même si cela est parfois remis en cause notamment si ces anticorps sont

présents en forte quantité en raison du pourcentage élevé de chiens atteints d'AHMI et présentant une auto-agglutination.

Ce phénomène d'auto-agglutination peut fausser le résultat donné par les automates d'hématologie, qui ne prennent pas en compte les hématies agglutinées (*Porter 1990*).

Certains auteurs considèrent que si une véritable auto-agglutination est présente, la réalisation du test de Coombs direct est inutile alors que d'autres préconisent de le faire systématiquement. Par ailleurs, si l'agglutination persiste après lavage, elle peut géner ou interférer avec la réalisation du TCD (*Giger 2005*, *Duval 1996*). Certains chiens présentant une auto-agglutination ont parfois un résultat négatif au TCD. Les anticorps responsables de l'agglutination pourraient, en effet, s'éluer lors du lavage, ou qu'ils peuvent être plus actifs à température ambiante qu'à 37°C (d'où un résultat négatif au TCD à 37°C) (*Cotter 1992*).

L'auto-agglutination est généralement associée à des formes sévères d'AHMI. Le taux de mortalité est plus élevé chez les chiens qui présentent une agglutination persistante que chez ceux qui n'en présentent pas (*Klag 1993*).

B. Sphérocytose

(Cf. Chapitre II)

C. Fragilité osmotique

La fragilité osmotique des GR est attestée par leur capacité à résister à un gonflement osmotique et à la lyse dans des solutions salines d'hypotonicité croissante. Les GR quand ils sont mis en suspension dans un milieu hypotonique, gonflent en effet pour atteindre un « volume hémolytique critique » à une « tonicité critique » avant d'être lysés. Lors d'AHMI, la fragilité osmotique augmente et on note la présence d'une sous-catégorie d'érythrocytes avec une fragilité différente : les **sphérocytes** (*Taylor 1990*). Les sphérocytes ont une capacité d'échange diminuée à cause de leur taille réduite et de la perte de certains constituants membranaires, c'est pourquoi le « volume hémolytique critique » est atteint plus rapidement. Les sphérocytes sont lysés dans des solutions de concentration beaucoup plus faibles en NaCl (solutions plus hypotoniques) que les érythrocytes des animaux sains (*Giger 2005*).

La rémission clinique et biologique de l'AHMI après traitement s'accompagne d'un retour à la normale de la fragilité osmotique (*Jain 1973*).

Dans **85 % des cas** d'AHMI canines, la fragilité osmotique des GR est augmentée et donc le test de fragilité osmotique des GR est positif (*Lewis 1989*).

Cependant, cette fragilité osmotique est également augmentée dans d'autres cas, notamment les cas de polyarthrites auto-immunes du chien (*Jain 1973, Poitout 1994-1995*).

D. Mise en évidence d'un revêtement anticorps sur les hématies

1. Test de Coombs direct

Pour cette partie, le lecteur aura avantage à se rapporter au travail de thèse d'Emanuelle Gerber : " Applications du test de Coombs direct", soutenu parallèlement à notre travail.

1.1.Définition, principe

Le test de Coombs direct, aussi connu sous le nom **de test à l'antiglobuline** a été décrit pour la première fois en 1945 pour une utilisation chez l'homme par le Docteur Coombs, un vétérinaire immunologiste de l'Université de Cambridge (Grande Bretagne). Ce dernier a émis l'hypothèse que des anticorps dirigés contre les globulines humaines pouvaient être produits chez des lapins immunisés avec ces globulines, et les anticorps contenus dans le sérum de ces lapins pouvaient ensuite s'attacher aux globulines fixées sur la surface des hématies humaines, provoquant une agglutination (*Thrall 2004*)

Ainsi, le revêtement anticorps recouvrant les GR peut être à l'origine d'une auto-agglutination des hématies en milieu salin. Le plus souvent cependant, les anticorps sont des **anticorps incomplets** (classe III, la plus fréquente chez le chien), c'est-à-dire des anticorps qui sensibilisent les GR mais ne provoquent pas d'agglutination sans l'addition d'un réactif « antiglobuline » ou de facteurs qui modifient le potentiel de membrane des GR (*Switzer 1981*). Le TCD est le test classiquement utilisé pour **détecter la présence d'anticorps incomplets fixés aux GR** (*Barker 2000*), une **antiglobuline** provoquant l'agglutination (*Wardrop 2005*).

La majorité de ces Acs incomplets sont des IgG, détectées avec un sérum anti-IgG, moins fréquemment des IgM. Ces Acs incomplets peuvent induire une activation du complément, et les réactifs « antiglobuline » utilisés réagissent aussi avec les composants du C fixés à la surface des GR, C3 et C4 principalement (*Wardrop 2005*).

En conclusion, le test de Coombs se définit comme une méthode immunologique, permettant la **détection des anticorps non agglutinants**, grâce à l'action d'un **sérum** xénogénique (= produit chez un individu d'une autre espèce) **anti-immunoglobuline**, provoquant l'agglutination. Le TCD ou test à l'antiglobuline démontre ainsi la sensibilisation des hématies soit par une Ig, soit par le C, soit par les deux, présents à la surface érythrocytaire. Son principe est de créer grâce à des « anticorps anti-anticorps » ou antiglobuline spécifique d'espèce, des ponts entre les anticorps ou le C qui recouvrent la surface des hématies, ce qui provoque une agglutination visible macroscopiquement. On utilise dans un premier temps des antiglobulines polyvalentes, dirigées contre toutes les globulines sériques de l'espèce cible, puis éventuellement dans un second temps des méthodes plus spécifiques (*McCullough 2003, Day 2000, Miller 2003, Thébault 2005, Fournel 1994*).

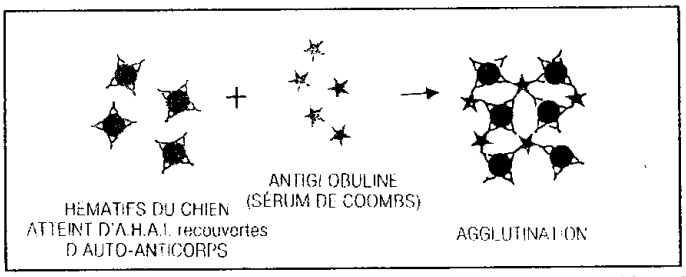


Figure 15 : Représentation schématique d'un test de Coombs positif, d'après *(Person 1988)*

1.2.Nature de l'antisérum

Les **réactifs** « antiglobuline », humains ou animaux **spécifiques d'espèce** sont généralement produits chez des lapins et des chèvres. Des IgG, des IgM et/ou du C purifiés issus de l'espèce dans laquelle on veut utiliser le réactif sont injectés à des lapins ou à des chèvres à des intervalles réguliers, l'antisérum résultant est récupéré (*Mazza 1994*). Des réactifs polyspécifiques contenant des anticorps anti-IgG, anti-C3 (anti-C3d +/- anti-C3b), anti-IgM voire anti-C4 sont présents dans la majorité des produits vétérinaires (*Wardrop 2005*).

Classiquement, le TCD est réalisé en utilisant un **sérum polyspécifique** (*Stewart 1993b*). Toutefois, des sérums plus spécifiques peuvent être utilisés dans un second temps pour améliorer sensibilité et spécificité du test. Une bonne sensibilité est obtenue avec un **sérum anti-IgG et C3** (mélange à volumes égaux) puisque l'utilisation de réactifs spécifiques montrent que le plus souvent, l'hématie est sensibilisée par une IgG seule ou associée à un composé du complément, en particulier du C3d (*Fournel 1994, Jones 1990, Wardrop 2005*). L'utilisation de **sérum monospécifique** est plus spécifique mais l'intérêt d'un sérum anti-IgM est discutable. En effet, les GR porteurs d'IgM fixent de façon irréversible la fraction C3 du complément et agglutinent donc en présence d'un sérum anti-C3. D'autre part, ils agglutinent rarement en présence d'un sérum anti-IgM car les IgM sont éluées des GR à 37°C, alors que la fixation du C3 persiste après lavage à 37°C (*Lewis 1989, Poitout 1994-1995*). Ainsi, les IgM peuvent être dépistées par le TCD « anti-complément » (sérum anti-C3) ou par un TCD à froid qui évite l'élution de ces IgM au cours du lavage. On parle alors d'agglutinines froides pour désigner ce type d'antigènes. Selon Slappendel, des titres significatifs en anticorps froids sont, cependant, très rares chez les chiens atteints d'une AHMI (*Slappendel 1979*). Les réactifs antiglobulines anti-IgA sont rarement utilisés chez le chien, la présence d'IgA sur les globules rouges lors d'AHMI étant très rare d'après de nombreux auteurs (*Fournel 1994*).

Ainsi, il est possible d'utiliser
- un sérum polyspécifique anti-IgG, IgM et C3,
- des sérums monospécifiques anti-IgG, anti-IgM et anti-C3,
- des sérums bispécifiques.

1.3.Technique

a. Prélèvement sanguin

Il convient de prélever le sang sur **anticoagulant**, citrate ou EDTA (*Fournel 1994*). Il est, en effet, très important que le milieu contenu dans le tube contienne un **agent chélateur du calcium**, car la présence de calcium dans le prélèvement provoque une fixation non spécifique du C sur les GR dans le tube, à l'origine de réactions faussement positives, c'est pourquoi l'héparine n'est pas un anticoagulant adapté dans ce cas (*Lewis 1989*).

L'**EDTA** et le **citrate** évitent, tous deux, la fixation du C3 in vitro, et donc les résultats positifs dus au C indiquent bien une liaison du C *in vivo*. Le choix EDTA/citrate varie selon les publications. Une hémolyse pourrait survenir lorsque le prélèvement sanguin est réalisé sur un tube à EDTA, ce qui peut conduire à une diminution du titre du TCD. Cependant cette hémolyse semble plus être liée à la manipulation qu'à l'anti-coagulant. Par ailleurs, d'après certains auteurs, l'EDTA peut induire une modification morphologique des GR s'il est présent en excès et cela pourrait avoir un effet sur la fragilité des GR et la fixation des anticorps. Il semblerait que le citrate soit légèrement meilleur (*Jones 1990*) que l'EDTA, mais que ce dernier reste le plus utilisé (*Wardrop 2005*).

Il est préférable d'effectuer le prélèvement **avant tout traitement corticoïdes** pour éviter des résultats faussement positifs.

b. Réalisation du test

- Lavage et centrifugations

Les GR du patient sont d'abord lavés, cette étape est importante car un lavage inadapté peut entraîner des faux positifs ou des faux négatifs (*Halliwell 1978*). Une hémolyse pourrait survenir lors de cette étape. Plusieurs études ont été réalisées, en particulier en médecine humaine, pour évaluer la solution de lavage la plus adaptée, il semble que le **PBS isotonique** (solution saline tamponnée) soit la solution la plus adaptée, et donne des titres plus élevés comparativement à d'autres solutions (*Jones 1990*).

L'étape de lavage est suivie par une centrifugation (de 800 à 1 500 g pendant 5 minutes).

L'opération lavage/centrifugation est classiquement répétée 3 à 5 fois. Si une auto-agglutination persiste tout de même, des lavages/centrifugations supplémentaires peuvent être réalisés.

L'échantillon est finalement remis en suspension à 2% dans une solution de PBS isotonique.

- Mise en contact des GR du patient et de l'anti-sérum

Différentes **dilutions** de l'antisérum (ou réactif de Coombs) sont disposées dans des cupules, dans lesquelles est ajoutée la suspension de GR. Le mélange ainsi formé subit une **incubation** de 30 minutes à 37°C puis encore 30 minutes supplémentaires à température ambiante. D'autres études préconisent une heure de contact à 37°C avec différentes dilutions de l'antisérum, puis 1 heure à 1 heure et demi de contact à température ambiante.

- Lecture

La lecture de l'agglutination se fait à l'œil nu (éventuellement sur un miroir de Kahn) ou au microscope (grossissement 100) (*Halliwell 1978*) et l'intensité de la réaction est quantifiée, le titre correspondant à la plus faible dilution de l'antisérum entraînant une réaction positive.

- Utilisation de témoins

Des témoins négatifs doivent dans la mesure du possible être réalisés en parallèle. Ils sont constitués de :

- la **suspension à 2% des GR du malade** en présence de **soluté isotonique de NaCl,** afin de vérifier que les GR du malade ne s'auto agglutinent pas spontanément, en l'absence d'antiglobuline. Les auto-agglutinines sont responsables d'une véritable auto-agglutination spontanée, à 37°C (classe I) ou à 4°C (classe IV).

- Une **suspension à 2% des GR d'un chien sain témoin** en présence du **sérum antiglobuline** spécifique d'espèce, pour contrôler la bonne conservation de l'antisérum et vérifier qu'il n'y ait pas de réactivité non spécifique du réactif (*Jones 1990*).

1.4.Interprétation

Un résultat positif associé à une anémie régénérative hémolytique permet de conclure à **l'origine immunologique** de l'anémie (*Gaillot 1998*) mais il ne permet pas de faire la

différence entre AHAI et AHMI (*Day 2000*).

Pour certains auteurs, le type d'anticorps et/ou de composés du complément fixés à la surface des GR et détectés par l'utilisation d'antisérum monospécifiques permettrait de préciser l'origine de l'anémie.
Ainsi, pour un TCD positif :

- **de type IgG**, la nature immune de l'anémie serait très probable (*Slappendel 1979*) ;
- **de type « IgG + C »**, l'interprétation est plus discutable car il n'est pas certain que le C se soit fixé sur le complexe IgG-antigènes membranaires (*Fournel 1994*) ;
- **de type « C pur »**, il est encore plus difficile de définir la sensibilisation exacte des hématies. Il est possible qu'une partie des tests de Coombs de type « C » correspondent à la fixation transitoire d'un complexe Ag/Ac, rapidement élué de l'hématie et donc qui active insuffisamment le C pour provoquer des dommages cellulaires. Chez les chiens avec un TCD positif pour le C seul, il y a souvent une autre affection associée : atteintes infectieuses, inflammatoires ou néoplasiques (*Day 2000, Miller 2003*). Par conséquent, les TCD positif pour le C seul sont plutôt communs chez le chien lors d'affections diverses et sont rarement associés à des hémolyses sérieuses. Ce type de test de Coombs pourraient néanmoins correspondre au cas où les anticorps sont présents en trop faible quantité pour être détectés par le TCD (*Slappendel 1979*).

Il n'y a pas d'association claire entre le titre en anticorps fixés sur les GR et la sévérité de l'anémie, bien que des réactions à titre faible soit plus fréquemment associées à des AHMI secondaires qu'à des AHAI (*Day 2000, Miller 2003*). Par conséquent, l'intensité du TCD ne présage pas nécessairement de la sévérité de l'hémolyse observée cliniquement (*Giger 2005*).

1.5.Résultats du TCD

Le pourcentage de chiens atteints d'AHMI et présentant un résultat positif au TCD est variable : de **35 %** *(Miller 2003)*, à **37 %** (*Reimer 1999, Slappendel 1979*), **48 %** *(Jones 1990)*, **66 %** (*Jacobs 1984*) à **77%** (*Carr 2002, Weinkle 2005*) voire **89%** (*Burgess 2000*) sachant que dans la majorité des études, si une auto-agglutination est présente, le TCD n'est pas réalisé, ce qui peut fausser ces pourcentages. Les réactifs employés sont dans la plupart des cas polyspécifiques.

Lors d'anémie immunologique arégénérative, le pourcentage d'animaux atteints et présentant un TCD positif est également variable : de 0% (*Weiss 2002*) à 26,7% (*Gilmour 1991*) ou 50% des cas (*Weiss 2000*) selon que la réaction immune vise spécifiquement les précurseurs érythroïdes médullaires ou simultanément ces précurseurs et les GR circulants.

Le TCD souffre aussi d'un manque de standardisation. Il existe une grande variété entre les réactifs utilisés par les différents laboratoires, les températures de l'analyse, les dilutions des échantillons...les preuves de l'utilité clinique et des valeurs prédictives du test pour diagnostiquer une AHMI font défaut en médecine vétérinaire. Des résultats négatifs sont décrits chez des chiens qui, d'après leurs données cliniques et biologiques, semblent avoir une AHMI. Au contraire, des résultats positifs, notamment dus au C sont communément rapportés en l'absence d'affection hémolytique significative (*Scott 2000*). Enfin, il n'existe actuellement pas de consensus dans la littérature concernant le seuil de positivité du TCD.

1.6.Sensibilité, spécificité

Le TCD présente une spécificité et une sensibilité moyennes (*Gaillot 1998, Stewart 1993b, Thébault 2005*).

a. Manque de spécificité, faux positifs

Les faux positifs seraient plus rares que les faux négatifs (*Thébault 2005*, *Wardrop 2005*, *Fournel 1994*) et reconnaîtraient différentes causes.

i. Problèmes techniques

- tubes sales,
- solution saline contaminée avec des métaux lourds, de la silice colloïdale, des bactéries,
- centrifugation trop intense,
- lecture tardive ou utilisation de sang mal conservé. En effet, si le sang est mal conservé, le C peut s'adsorber de façon non spécifique *in vitro* sur les GR et conduire à des faux positifs (*Switzer 1981*, *Lewis 1989*, *Wardrop 2005*),
- tubes avec un gel siliconé,
- sang stocké dans des tubulures ayant servi à l'administration de dextrose,
- présence de Ca^{2+} libre dans le prélèvement conduisant à une fixation non immune de C sur les GR.

ii. Problèmes biologiques

- Patients bactériémiques

Il a, en effet, été montré chez l'homme qu'il existait des crypto-antigènes dits de « Thomsen-Freidenreich » naturellement présents à la surface des GR, ces Ags sont normalement cachés par l'acide N-acétyl-neuraminique, mais ils peuvent être exposés ou activés suite à l'action de neuraminidases bactériennes, notamment lors de bactériémie (*Kelton 1985, Wardrop 2005*).

- Présence d'auto-Acs naturels réactifs à froid

Il existe, en effet, des agglutinines non pathogènes réactives à froid chez les animaux en bonne santé, ces anticorps sont souvent des IgM qui lient les GR à basse température et provoque la fixation du C. Même si les IgM se détachent des GR à des températures plus élevées, le C reste fixé et peut donc être détecté par un TCD standard réalisé à 37°C (*Wardrop 2005*). Le stockage des échantillons de sang à 4°C ou la réalisation de TCD à une température inférieure à 37°C peut entraîner le fixation de ces auto-anticorps froids non pathogènes sur les GR (*Barker 2000*).

- Anticorps anti-phospholipides

En médecine humaine, il a été montré que des hommes sains pouvaient présenter un résultat positif au TCD s'ils possédaient des Acs anti-phospholipides.

- Réaction croisée entre les réactifs antiglobulines et la membrane des GR

Le réactif de Coombs peut, en effet, contenir s'il est insuffisamment purifié des anticorps dirigés contre l'albumine, la transferrine ou une autre protéine plasmatique attachées à la surface du GR (*Barker 2000*). On peut aussi avoir la présence naturelle d'hétéroagglutinines dans l'antisérum hétérologue qui se lient à des antigènes non définis de la membrane érythrocytaire (*Lewis 1989*).

- Transfusions sanguines

Des allo-anticorps post-transfusionnels peuvent interférer avec le résultat du TCD si une transfusion est réalisée 2 à 30 jours avant le test (*Halliwell 1978, Thébault 2005*).

- Patients asymptomatiques

Dans les conditions habituelles, les GR « normaux » portent une petite quantité d'IgG et de C à leur surface, ce qui peut induire des faux positifs. Dans l'étude de Merry et al. portant sur des GR humains « normaux » et pour lesquels les TCD sont négatifs, 5 à 90 IgG par GR ont été mises en évidence et 5 à 560 composants C3. Si environ 100 IgG ou composants du C sont présents sur un GR, le TCD peut être faiblement positif et par conséquent des TCD positifs sont occasionnellement rapportés chez des individus sains sans signes d'anémie, ni d'hémolyse (*Wardrop 2005, Dodds 1983a, Giger 2005*).

Par ailleurs, de faibles taux d'Ig liées aux GR pourraient être détectés chez au moins 78 % des chiens qui ont une anémie quelle qu'en soit l'origine (*Barker 2000*), ce qui ne serait pas spécifique d'une anémie immunologique.

- Modifications des antigènes membranaires

Des anticorps non pathogènes peuvent se lier à des épitopes induits lors de changements membranaires érythrocytaires.
Ces changements membranaires peuvent survenir dans différentes occasions :
- lors du passage des GR à travers un néoplasme (*Stewart 1993b*),
- au cours d'une CIVD,
- si le prélèvement a été mal conservé (*Jones 1990, Thébault 2005*), ce qui conduit à des altérations des GR,
- les épitopes peuvent également être induits par l'anticoagulant ou une activation cellulaire (*Scott 2000*).

- Adsorption non spécifique d'immuns complexe ou d'anticorps (*Fournel 1994*)

  - Complexes immuns

De nombreuses publications en médecine humaine relatent l'adsorption de médicaments à la surface des GR et le fait que le TCD puisse mettre en évidence des anticorps dirigés contre les antigènes des médicaments, alors que ces anticorps ne sont pas pathogènes pour les GR. Ce phénomène peut aussi survenir avec des hémoparasites comme *Babesia canis* ou lors de dirofilariose. Ceci serait en réalité possible pour n'importe quel immun complexe qui est absorbé de façon non spécifique à la surface des GR (*Halliwell 1978, Stewart 1993b, Calvert 2000*).

  - Liaisons non spécifiques d'anticorps plasmatiques présents en grande quantité

Cela concerne toute atteinte infectieuse, inflammatoire, néoplasique et immunologique qui ne provoque pas d'AHMI, mais induit un excès d'anticorps plasmatiques qui peuvent se fixer de façon non spécifique aux érythrocytes mais ne provoquent pas d'AHMI (*Honeckman 1996, Thébault 2005, Gaillot 1998*).

  - Fixations des composants du complément

Quand des techniques très sensibles sont utilisées, des traces de C3 peuvent être détectées régulièrement sur des GR d'individus sains (*Jones 1992*). Ainsi, la majorité des

chiens avec un TCD positif pour le C3 seul ne serait pas atteinte d'AHMI mais de n'importe quelle pathologie (*Barker 2000*).

- Hypergammaglobulinémie, gammapathie monoclonale ou polyclonale

Lorsqu'une hypergammaglobulinémie, une gammapathie monoclonale ou polyclonale sont présentes, on peut observer une liaison non spécifique des Ig aux GR à cause de leur trop forte concentration plasmatique (*Kelton 1985, Wardrop 2005*).

b. Manque de sensibilité, faux négatifs

Les faux négatifs au TCD varient de **14 %** (*Slappendel 1979*) à **32 %** (*Switzer 1981*) ou **42 %** (*Jackson 1985*) chez les chiens présentant une AHMI *(Barker 1993)*.

Des problèmes techniques et biologiques peuvent expliquer ces faux négatifs (*Cotter 1992, Fournel 1994, Miller 2003, Switzer 1981, Worlledge 1978*).

i. Problèmes techniques

- Une élution spontanée des anticorps peut survenir, suite à :
  - Un délai d'acheminement trop long,
  - Un pH de la solution de lavage inadapté (il doit être d'environ 7 à 7,2),
  - Une interruption de l'étape de lavage,
  - Un ajout tardif du réactif antiglobuline à la suspension de GR,
  - Une agitation excessive lors de la lecture du test,
  - Une centrifugation insuffisante.

- Mauvaise réactivité du réactif

Cela peut survenir si le réactif est contaminé avec des bactéries, du sang ou du sérum, ou s'il a subit des congélations répétées (*Wardrop 2005*).

- Présence de résidus plasmatiques

Si le lavage est incomplet et qu'il reste des résidus plasmatiques, cela induit des faux négatifs car les protéines sériques neutralisent l'activité du réactif en se combinent aux antiglobulines et empêchent l'effet de « pont » responsable de l'agglutination et donc de la positivité du TCD (*Wardrop 2005, Lewis 1989*).

- Antisérums inadaptés en force ou en direction (non spécifiques de l'espèce)

Le TCD peut être négatif si l'antisérum est trop faible ou s'il est trop puissant. Dans ce deuxième cas, un phénomène de « zone » (ou « prozone ») se produit, l'excès en anticorps ou en hématies sensibilisées empêchant l'agglutination (*Thébault 2005*). Ainsi, si le test est négatif et qu'il y a une forte suspicion clinique, des dilutions supplémentaires doivent être réalisées pour éliminer cet effet de prozone (*Stewart 1993b*).

- Température du test différente de la température d'activité des anticorps

En particulier, les agglutinines froides sont incapables de se lier aux GR à la température du corps (37°C).

ii. Problèmes biologiques

- Phase de rémission de la maladie

- Quantité d'anticorps fixés sur le GR trop faible pour être détectée (inférieure au seuil de détection de la technique). Il est nécessaire qu'il y ait au moins 100 IgM par hématie et 500 IgG par hématie pour que les immunoglobulines puissent être détectées lors du TCD. Dans le cas contraire, les molécules d'Ig ne sont pas assez proches pour être liées par l'antisérum (*Stewart 1993b*). Cependant des quantités inférieures au seuil de détection sont rarement rencontrées, cela surviendrait dans environ 2 % des cas (*Lewis 1989*).

- Suppression des anticorps par un traitement en cours, notamment une corticothérapie préalable pendant plus d'une semaine (*Halliwell 1978, Honeckman 1996, Thébault 2005*), et ce, même si les signes d'hémolyse sont encore présents.

1.7.Amélioration de la spécificité

Face à un TCD positif, d'autres tests sont nécessaires pour éliminer les faux positifs et déterminer plus précisément la nature de l'anticorps fixé à la surface des hématies. De nombreuses méthodes ont été décrites mais peu sont utilisées en pratique.

a. TCD à l'antiglobuline monospécifique

Comme décrit précédemment, en médecine vétérinaire, le TCD est classiquement réalisé en utilisant un réactif poly-spécifique. Dans un second temps, des anti-globulines mono spécifiques (anti-IgG puis anti-C3 utilisées séparément) peuvent être utilisées pour caractériser la nature du revêtement anticorps.

b. Test de Coombs Indirect (TCI)

i. Principe

Le TCI est utilisé en médecine humaine pour déterminer la présence d'**anticorps circulants** dans le **plasma**. Son principe est de détecter les **auto-anticorps** anti-GR, libres dans le sérum du patient ou dans un éluat préparé à partir de ses GR (technique d'élution-fixation) en les incubant avec des GR normaux (*Day 2000, Switzer 1981*).
Comme pour le TCD, cette méthode est basée sur la capacité du réactif antiglobuline à agglutiner des GR de chiens sains, ceux-ci ayant au préalable été incubés avec les auto-anticorps contenus dans le sérum du malade (*Barker 1993b*) *(cf.figure 16)*. Cependant, il y a souvent des faux négatifs lors d'AHAI (*Barker 1993b*).

ii. Réalisation

Le sang du malade est prélevé sur **tube sec** puis centrifugé, ce qui permet de récupérer son sérum. Le **sérum** à tester est incubé avec des GR, lavés trois fois de chien normal du même groupe sanguin que celui du malade afin d'éliminer les faux positifs liés à une allo-agglutination (*Halliwell 1978*). On procède comme pour un TCD, c'est-à-dire qu'une fois que les auto-anticorps du sérum du chien malade se sont fixés sur les GR sains, on soumet ces complexes GR/Ac à un antisérum polyspécifique comme pour le TCD.

iii. Interprétation

Une réaction positive signe l'existence d'anticorps ayant une **réactivité anti-hématie**, donc de type auto-anticorps. Les anticorps dirigés contre un xéno-antigène ne réagiront pas avec les GR sains puisque les antigènes sont absents. Ainsi, si la cible de l'anticorps est un antigène érythrocytaire intrinsèque, cela confirme le diagnostic de AHAI *sensu stricto* (*Lewis 1989*).

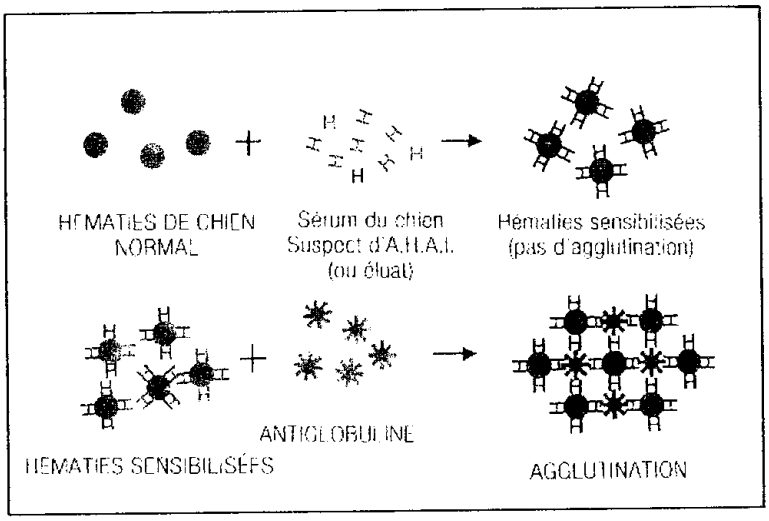


Figure 16 : Représentation schématique d'un TCI positif, d'après (*Person 1988*)

iv. Inconvénients

Le TCI présente néanmoins plusieurs inconvénients :

- Les **allo-anticorps anti-antigènes de groupes sanguins** peuvent aussi donner une réaction positive. D'après certains auteurs, les allo-anticorps 'naturels' chez le chien sont rares (15% des cas) et présents de toute façon en titre faible, si bien qu'ils interfèrent peu. Au contraire, plusieurs auteurs anglo-saxons déconseillent l'utilisation de ce test car ils accordent une part plus importante à ces allo-anticorps et donc au nombre de faux positifs lors du TCI (*Halliwell 1978*).

- Le **taux** en **anticorps libres** dans le sérum peut être **trop bas** pour être détecté (*Scott 2000*) car tous les anticorps présents sont solidement fixés aux GR (*Lewis 1989*). Les auto-anticorps seraient, en effet, présents en faible concentration dans le sérum, ne permettant l'obtention d'un **TCI positif** que dans **40 %** des cas d'AHAI et faisant de lui un test **peu sensible** (*Thébault 2005, Dodds 1983a, Fournel 1994*). Ceci pourrait être contourné par la méthode d'élution-fixation.

- Les anticorps auto-réactifs peuvent être difficilement distinguables des complexes immuns circulants et des anticorps réactifs à froid non pathogènes (*Scott 2000*).

La majorité des alternatives utilisées pour améliorer la sensibilité du TCD (qui vont être décrites par la suite) peuvent être transcrites pour le TCI (*Lewis 1989*) et d'autres méthodes peuvent être utiliser pour améliorer spécifiquement le TCI.
Ainsi, une alternative au TCI implique l'utilisation de **protéines A radio marquées staphylococciques** (SPA) pour la détection d'un **faible titre d'IgG anti-GR circulantes**. Ceci est basé sur le fait qu'une protéine de la paroi des staphylocoques se fixe sur la portion Fc des molécules d'IgG chez la plupart des mammifères. Par conséquent, l'incubation du sérum du patient avec des GR de chien sain, suivi de l'exposition à la SPA radio marquée peut résulter en une augmentation de l'assimilation radioactive des GR si le sérum contient des anticorps anti-GR. Cette procédure est beaucoup plus sensible que le TCI standart, mais elle est peu disponible en pratique (*Kaplan 1983, Lewis 1989*).

c. *Epreuve d'élution-fixation*

Ce test se rapproche du TCI.

L'**élution** consiste en la rupture des forces de liaison GR/Ac en utilisant des méthodes physico-chimiques. La **fixation** permet la détermination de l'activité sérologique et de la spécificité des Ac en utilisant des GR de composition antigénique connue qui vont fixés les Ac élués. L'éluat est sans activité sérologique si seul le C est fixé sur les GR (*Wardrop 2005*). Comme le TCI, ce test permet de détecter d'éventuels **auto-anticorps** qui réagissent avec les hématies saines, c'est-à-dire dépourvues de xéno-antigènes. Ce test est particulièrement intéressant lorsque l'on suspecte un faux positif lors du TCI (*Poitout 1994-1995*).

La technique d'élution par la chaleur (15 min à 56°C) est la meilleure lorsque l'anticorps est actif à basse température. Par contre, les méthodes par addition d'éther, par abaissement du pH (milieu acide) ou par augmentation de la force ionique (chlorure de sodium hypertonique) sont préférables lorsque l'anticorps est actif à 37°C.

1.8.Amélioration de la sensibilité du TCD

Les tests qui améliorent la sensibilité ont en général une spécificité moins bonne que celle du TCD.
Les limites de sensibilité de la technique sont liées à l'importance du revêtement anticorps (nombre de molécules d'Ig par hématie) et à la nature des anticorps en cause (comportement thermique avec élution rapide des IgM, spécificité anti-IgA absente de l'anti-globuline polyvalente...)

a. TCD à froid

Avec cette technique, on cherche à mettre en évidence des **anticorps** ayant une **activité à froid** et ayant tendance à **s'éluer spontanément à 37°C** (classe IV ou V).

Après prélèvement, les hématies sont conservées 12 heures à + 4°C puis lavées à froid (milieu salin à + 4°C) et centrifugées à froid. L'incubation des hématies à lieu avec l'anti-globuline à 4°C et non à 37°C.

Certains auteurs recommandent la réalisation systématique de ce test de Coombs à froid afin de rechercher ces auto-anticorps froids pathogènes (*Jones 1990*), bien qu'il soit difficile de différencier les anticorps froids non pathogènes des Ac pathogénes même si le test est ensuite répété entre 25 et 30°C. D'autres auteurs préfèrent réaliser le TCD uniquement à 37°C et utiliser le C3 seul fixé sur la membrane des GR comme marqueur d'auto-anticorps froids actifs à basse température fixant le C (*Barker 2000*). Par ailleurs, quelques auteurs préconisent même de ne pas valider le TCD lorsqu'il est réalisé à 4°C car il serait positif chez un grand nombre de chiens sains, à cause des anticorps froids non pathogènes, ce qui pourrait conduire à un diagnostic erroné d'AHMI. La seule exception serait un patient avec des signes d'affections à anticorps froids (nécrose des extrémités), dans cette situation, un TCD positif à 4°C pourrait, alors, supporter mais non confirmer le diagnostic (*Switzer 1981*).

Remarque : lors d'anémie immunologique centrale, le TCD à froid est souvent plus fortement positif que le TCD à chaud et persistant dans le temps (*Fournel 1994*). Les anticorps impliqués dans ce type d'anémie paraissent donc le plus souvent avoir un comportement thermique d'anticorps froids (*Fournel 1994*).

b. Utilisation de solutions salines à faible concentration

On peut réaliser un TCD en utilisant comme solution de lavage et de suspension, des solutions salines à faible concentration (« low ionic salin solution » : LISS). La solution LISS favoriserait, en effet, l'interaction antigène-anticorps. Cela augmenterait ainsi la sensibilité du test en dévoilant des sites antigéniques peu accessibles à certains anticorps et donc en augmentant la quantité d'anticorps anti-hématies fixés par GR (*Jones 1975, Lewis 1989*), mais

parallèlement cela augmenterait le nombre de faux positifs en dénaturant la membrane érythrocytaire (*Barker 2000*).

c. *Prétraitement enzymatique*

i. Principe

Le prétraitement des GR avec une enzyme protéolytique, la **papaïne**, augmente l'agglutination des hématies par les anticorps sériques sans recours au réactif anti-globuline. Le but rejoint celui lié à l'utilisation d'une solution « LISS ». Le test permet la mise en évidence d'**anticorps anti-GR sériques incomplets** qui peuvent **agglutiner** les **GR prétraités** par de la papaïne (*Barker 1993b*).

ii. Effets de la papaïne

Des études ont été menées afin de déterminer plus précisément le rôle joué par la papaïne.

Il a été suggéré que la papaïne modifiait la membrane des GR de façon à exposer plus d'antigènes et donc permettre une liaison plus facile des anticorps. Cependant, des études ont montré que la papaïne ne permettait pas l'exposition de **sites antigéniques supplémentaires** sur la membrane érythrocytaire. Toutefois, il est possible que certains épitopes antigéniques soient détruits par l'enzyme alors que d'autres antigènes cryptiques seraient exposés, les deux effets ayant été rapportés chez l'homme. Par ailleurs, la protéolyse médiée par l'enzyme pourrait détruire certains auto-antigènes importants et exposer des déterminants antigéniques qui réagissent avec des anticorps sériques normaux, augmentant ainsi le nombre de faux positifs lors de l'utilisation de cette enzyme.

Il a également été montré, par mesure de la mobilité électrophorétique des GR canins, que la papaïne diminue le potentiel « zeta » des GR, c'est-à-dire la **force électrostatique** qui fait que les GR se repoussent les uns des autres, en agissant notamment sur l'acide sialique des hématies. Les auto-anticorps incomplets sont donc capables de provoquer une agglutination car les forces électrostatiques entre les GR sont réduites. Chez l'homme cet effet sur le potentiel « zeta » n'est pas jugé suffisant pour être seul responsable de l'agglutination. Cependant chez le chien, le potentiel zêta est plus élevé que chez l'homme. Ce potentiel « zêta » élevé pourrait être un des facteurs qui contribue à la mauvaise sensibilité du TCD « classique » chez le chien (*Barker 1993b*) .

iii. Réalisation et lecture du résultat

Les **GR du malade** sont mélangés avec une **solution de papaïne** préparée selon un protocole codifié et une solution de phosphate isotonique (PBS), le tout est ensuite incubé 15 minutes à 37 °C. Les GR sont ensuite lavés et mis en suspension dans du PBS. Le **sérum du malade** est ensuite incubé avec ses **propres GR prétraités**. Le **sérum du malade** est également incubé avec des **GR prétraités** provenant de **chiens sains**, ce qui permet de mettre en évidence des auto-anticorps.

Le **résultat** est considéré comme **positif** si une agglutination macroscopique est observée à la fois lorsque que le test est réalisé avec des GR de l'animal malade et avec des GR provenant de chiens normaux.

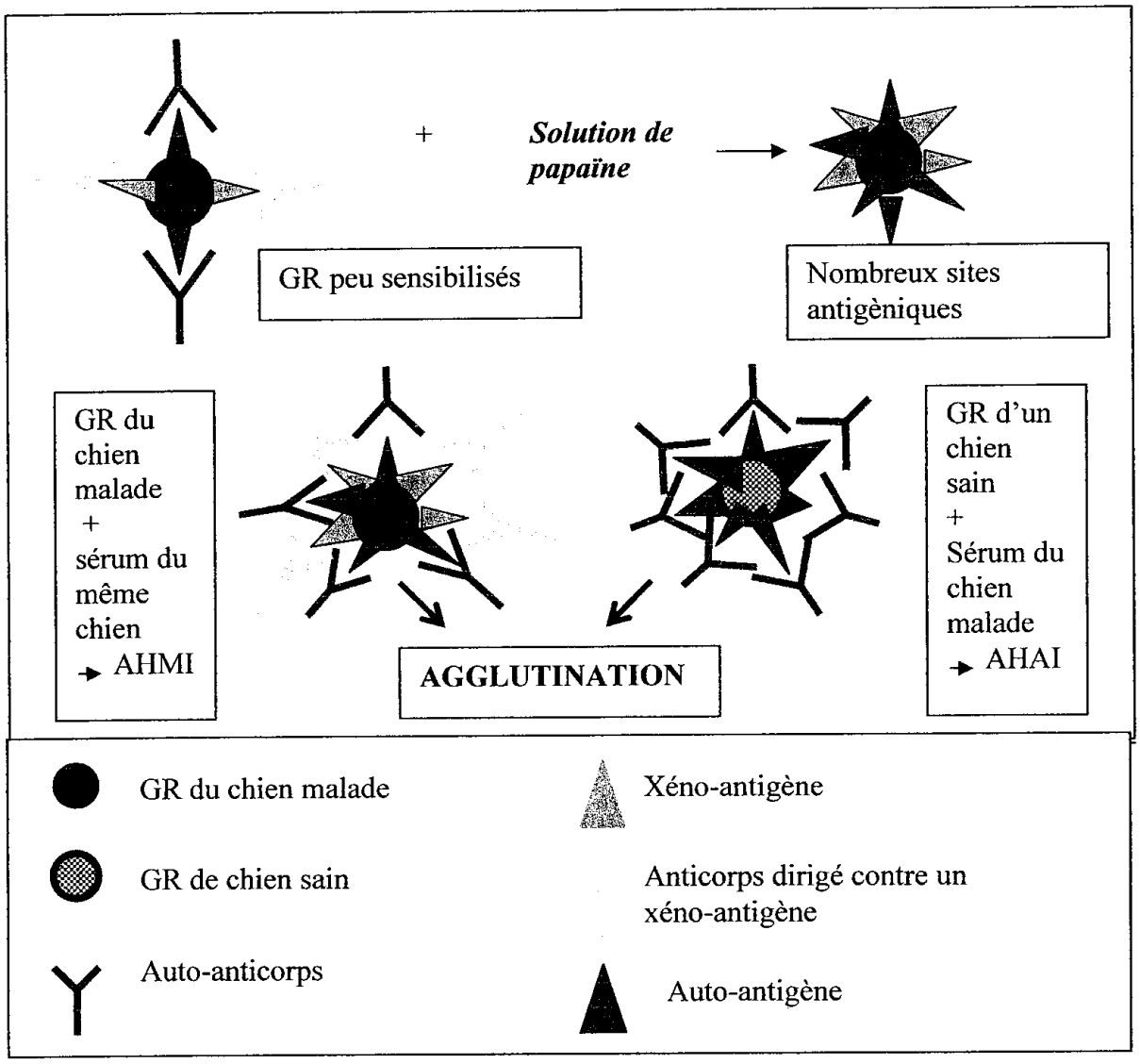


Figure 17 : Représentation schématique de l'amplification de l'agglutination via un prétraitement enzymatique

iv. Avantages et inconvénients

D'après certaines études, le test à la papaïne serait plus sensible que le TCD puisqu'il permettrait de détecter des cas d'AHMI présentant des résultats négatifs avec le TCD classique (*Jones 1986*), et il présente l'avantage de ne pas nécessiter un antisérum spécifique d'espèce (*Barker 1993b*). Par ailleurs, en faisant réagir le sérum du malade avec des GR sains prétraités, on peut mettre en évidence la présence d'auto-anticorps et donc d'une AHAI, comme dans le TCI.

Cependant, le test à la papaïne serait également positif chez des chiens avec une anémie non immunologique, ce test conduirait donc à des faux positifs en dénaturant la membrane érythrocytaire, il serait, par conséquent, moins spécifique que le TCD « classique » (*Barker 1993b*).

Remarque : Combinaison d'un prétraitement enzymatique à une solution saline de faible concentration

Certains auteurs conseillent de combiner un prétraitement enzymatique puis une mise en suspension dans une solution saline à faible concentration pour augmenter encore la

sensibilité (*Lewis 1989*). Cependant, cette combinaison ne semble présenter aucun avantage supplémentaire chez l'homme (*Barker 1993b*).

d. Utilisation de substances macromoléculaires (test au Polybrène)*

Des **substances hydrosolubles** telles que l'albumine, la polyvinylpyrolidone (PVP), le dextran, le ficoll peuvent favoriser l'agglutination des hématies par diminution du potentiel « zêta » et sont parfois utilisées comme un artifice technique. Dans le cas du test au ***Polybrène****, un polymère d'ammonium quaternaire (bromide d'hexadimethrine/polycation) diminue le potentiel « zêta » et provoque une agrégation non spécifique des hématies. Celle-ci facilite ainsi, en cas de revêtement anticorps, la survenue d'une réaction antigène-anticorps avec les anticorps agglutinants comme avec les anticorps non agglutinants (« anticorps incomplets »). Par neutralisation du polybrène (à l'aide d'une solution de citrate disodique), on entraîne la réversibilité de l'agglutination non immunologique polycationique tout en respectant l'agglutination immunologique résultant de la réaction antigène-anticorps lorsque existait un revêtement anticorps. Ce test permet la **détection d'un revêtement par « anticorps incomplets »** sans avoir recours à l'anti-globuline, il est **plus sensible** que le TCD. Il permet de mettre en évidence un revêtement de faible importance ou dont l'isotype est autre que ceux habituellement recherchés.

e. Gel test

Cette technique est largement utilisée en biologie humaine dans le cadre du groupage sanguin et de l'immuno-hématologie.

i. Réalisation et lecture

C'est une forme de **test d'agglutination en colonne**, les GR agglutinés étant retenus dans une matrice.

La solution de GR est ajoutée dans chaque microtube directement dans le gel qui contient un réactif monospécifique anti-globuline. La lecture peut se faire directement après centrifugation sans étape de lavage. La réaction est gradée en fonction de la distribution des particules agglutinées dans la matrice de gel. Les agglutinats restent en surface ou sont piégés par le gel. Les GR non agglutinés se retrouvent au fond du tube.

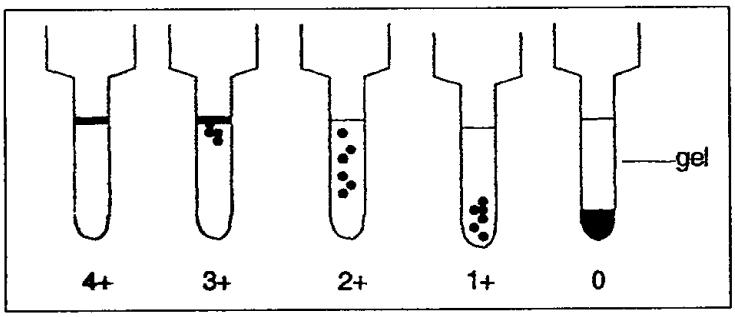


Figure 18 : Représentation schématique des résultats obtenus lors du gel test et gradation de ces résultats, d'après *(Wardrop 2005)*

ii. Avantages et inconvénients

Les **avantages** de la technique en gel par rapport à la méthode conventionnelle sont :
- une **interprétation** de la réaction d'agglutination **plus facile**. La technique conventionnelle requiert en effet un œil expérimenté surtout si la réaction est faible et la lecture doit parfois se faire sous microscope, ce qui n'est pas le cas pour la technique en gel ;

- **pas de procédure de lavage**, ce qui élimine les faux négatifs induits par le lavage (*Nathalang 1997*) ;
- une **réalisation** plus **facile** et plus **rapide**.

En ce qui concerne la **sensibilité** et la **spécificité** du gel test, les différentes études ne donnent pas les mêmes résultats. Dans la majorité des études publiées chez l'homme, la sensibilité et la spécificité du gel test apparaissent meilleures que celles de la méthode classique. Ainsi, d'après une étude réalisée sur 75 patients le gel test est plus sensible (sensibilité = 93,5%) et plus spécifique (spécificité = 88,6%), et permettrait d'amplifier le taux d'anticorps détectés fixés aux GR, surtout s'il s'agit d'IgG (*Nathalang 1997*). Au contraire, quelques études, notamment une réalisée sur 22 fœtus et nouveaux-nés, montre que la technique en gel serait moins sensible que la méthode conventionnelle, en particulier pour la détection du C3d. Or dans un certain nombre de cas, les GR ne sont liés qu'à des composants du C (*Tissot 1999*). En médecine vétérinaire, un test avec un gel neutre pour chien a été décrit et pourrait être commercialisé sur le marché vétérinaire mais cela manque encore de standardisation, puisque dans une étude utilisant ce gel, il y a plus de faux positifs et négatifs que dans la méthode classique, peut-être à cause d'une mauvaise technique ou d'un manque de réactivité du gel de la matrice (*Wardrop 2005*).

Cette technique est également applicable au TCI.

f. Cytométrie de flux

i. Principe et réalisation

La cytométrie de flux directe permet de déterminer la **classe des anticorps** présents sur les GR lors d'AHMI, de détecter le **pourcentage d'érythrocytes sensibilisés** par les anticorps et donc de suivre la réponse à la thérapie.

On utilise un **conjugué fluorescent** anti-IgG, IgM, IgA et anti-C3 qui se fixe aux anticorps liés à la membrane érythrocytaire. Ce conjugué est spécifique donc se lie très peu aux GR normaux (*Wilkerson 2000*).

ii. Avantages, inconvénients

La cytométrie de flux pourrait apporter un résultat **plus rapide**, **moins cher**, **plus sensible** et **objectif** pour quantifier la quantité d'Ig et de complément fixés à la surface des GR, en comparaison du TCD (*McCullough 2003*).

Récemment, deux études ont comparé la sensibilité et la spécificité de cette méthode à celles du TCD chez le chien. La **sensibilité** du TCD comparée à celle de la cytométrie est rapportée à 53% versus 92% (*Barker 1992*), et 58% versus 100% (*Wilkerson 2000*). La **spécificité** du TCD comparée à celle de la cytométrie est rapportée à 100% versus 100% (*Barker 1992*), et 100% versus 87,5% (*Wilkerson 2000*).
La cytométrie permettrait de détecter des quantités plus faibles d'anticorps (*Wilkerson 2000*).

Cependant, cette méthode manque encore de standardisation (*Kucinskiene 2005*).

g. Test direct à l'antiglobuline liée à une enzyme

i. Principe

Ce test, développé par Jones et al. en 1987, est aussi appelé **test « DELAT »** dans la littérature anglo-saxonne pour « direct enzyme-linked antiglobulin test ». Ce test est basé sur une **méthode immuno-enzymatique** ou méthode **ELISA** (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), les GR fixant les Ig étant mesurés par cette méthode. Les Ig peuvent également être recherchées dans le sérum ou l'éluat obtenu à partir des GR du malade via cette même méthode (*Barker 1993b*, *Day 1996*).

ii. Réalisation

Le test comprend 2 types d'anticorps (*Barker 2000*):

- des **anticorps** dits « **primaires** » : ce sont des anticorps anti-IgG, anti-IgM et anti-C3 canins, préparés chez le lapin, qui vont se fixer sur les immunoglobulines et/ou les éléments du complément liés aux GR du chien malade ;
- et des **anticorps** dits « **secondaires** » : ce sont des anticorps **conjugués**, c'est-à-dire liés à une enzyme phosphatase alcaline, préparés chez le mouton, anti-IgG de lapin. Ces anticorps secondaires vont donc se fixer sur les anticorps primaires.

Les GR sont mis en suspension après lavage dans des cupules de microtitration, puis ils sont incubés avec les anticorps primaires, lavés et ensuite incubés avec les anticorps secondaires, le substrat enzymatique (p-nitrophenyl phosphate) est alors rajouté, ce qui conduit à une réaction enzymatique. Après centrifugation, il y a transfert dans une plaque à microtitration propre et la lecture de la réaction enzymatique se fait par spectrophotométrie (*Jones 1987, Wardrop 2005*).

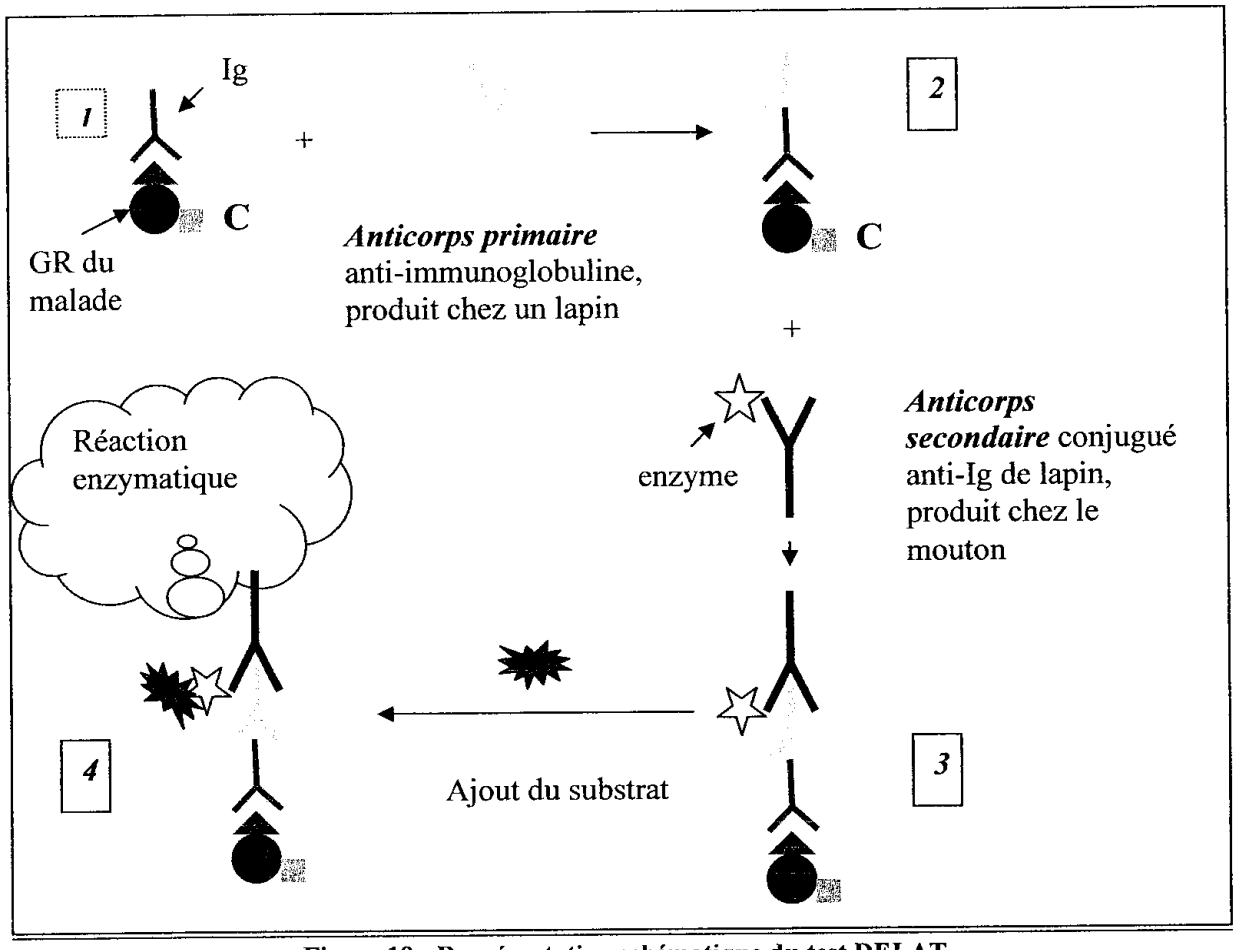


Figure 19 : Représentation schématique du test DELAT

iii. Avantages

Toutes les études s'accordent à dire que ce test est **plus sensible** que le TCD. Il permet de détecter des quantités d'Ig plus faibles fixées sur les GR (*Jones 1992*).

iv. Inconvénients

- Le test doit être réalisé très rapidement après le prélèvement sanguin, ce qui n'est pas toujours possible en pratique ;

- Une **réaction colorée artéfactuelle** liée à l'activité « phosphatase like » endogène chez des individus sains peut exister (*Jones 1992*) ;
- Ce test nécessite des **antigènes purifiés**, de synthèse ou recombinés ;
- C'est une **procédure longue** qui est surtout utilisée dans le domaine de la recherche ;
- Il existe tout de même des **faux négatifs** avec le test DELAT liés à une mauvaise technique, une faible capacité de liaison, une forte dissociation des anticorps liés aux membranes érythrocytaires ou une trop faible concentration des anticorps fixés sur les GR (*Jones 1987*) ;
- Ce test semble **moins spécifique** que le TCD. L'utilisation du test DELAT révèle, en effet, la présence d'anticorps sur la membrane érythrocytaire chez de nombreux chiens présentant une anémie non immunologique (*Day 1999*, *Barker 1993a*).

h. Test à l'antiglobuline radio-immunologique

Il s'agit du même principe que précédemment mais l'antiglobuline est ici détectée par une **méthode radio-immunologique** (*Scott 2000*). Ces tests sont peu utilisés en médecine vétérinaire et n'ont pas été testés cliniquement (*Honeckman 1996*).

1.9.Autres procédures immunodiagnostiques dans le cadre des AHAI canines

De nombreux cas d'AHMI ont des titres sériques significativement élevés en **anticorps anti-nucléaires (Acan)**, ce qui pourrait mettre en évidence une affection auto-immune primaire idiopathique. Le titre en **Acan** est **augmenté** chez environ 25% des chiens atteints d'AHMI, ce qui appuie la pathogénie à médiation immune de l'anémie (*Stokol 2000*). Le fort taux en Acan pourrait notamment suggérer la présence d'anticorps dirigés contre les protéines nucléaires des précurseurs érythroïdes (*Holloway 1990*).

La détermination de la **concentration sérique des composés du complément** (la diminution des concentrations en C3 et C4 pourrait refléter un dépôt sur la membrane érythrocytaire) ou de la **concentration sérique en IgA** (une déficience en IgA peut être associée à l'auto-immunité canine) pourraient être envisagée *(Day 2000).*

E. Myélogramme

Lors d'**anémie régénérative**, le myélogramme est souvent peu indiqué (*McCullough 2003*). S'il est réalisé, il met en évidence :

- une **hyperplasie médullaire érythroïde** ou **généralisée** (*Lewis 1989*). En effet, bien que la réponse à l'érythropoïétine soit assez spécifique, une stimulation des autres lignées peut parfois être présente, notamment une stimulation de la granulopoïèse lors d'AHMI (*Giger 2005*) ;
- une **augmentation** de nombre de **plasmocytes** (*Poitout 1994-1995*) ;
- une **diminution** du **ratio** éléments **myéloïdes/ érythroïdes** (*Switzer 1981*).

Le myélogramme peut aussi aider à écarter d'autres causes d'hémolyse, permettre de prédire l'évolution et confirmer le diagnostic. Le myélogramme est particulièrement utile si une AHMI est suspectée en dépit d'une réponse non régénérative.

Lors **d'anémie arégénérative**, la réalisation d'un myélogramme s'impose. Il met alors en évidence :

- Une **moelle osseuse normo à hypercellulaire** ;

- Des signes en faveur d'une **dysérythropoïèse** (*Fournel 1994*). Il peut, en effet, y avoir un arrêt apparent de la maturation. Le stade de l'arrêt varie du proérythroblaste à l'érythroblaste polychromatophile ou acidophile, mais les **arrêts de maturation** sont le plus souvent observés au niveau du stade d'érythroblastes polychromatophiles (*Holloway 1990, Jonas 1987, Stokol 2000*);
- Quelquefois, des images de **phagocytose** des érythrocytes ou de leurs précurseurs sont observées (*Jonas 1987*) ;
- Des modifications concernant les autres lignées sanguines peuvent également être retrouvées (*Fournel 1994*) : en hyper ou en hypo ;
- Un stock important de fer médullaire est généralement présent ;
- Une **myélofibrose** peut parfois est observée, c'est pourquoi la moelle osseuse peut être difficile à aspirer chez des chiens avec une ANRMI. La pathogénie exacte n'est pas claire, mais cela pourrait résulter de mécanismes intra-médullaires responsables d'une prolifération fibroblastique. Des mécanismes à médiation immune pourraient également jouer un rôle dans la pathogénie (*Scott-Moncrieff 1995*). Celle-ci pourrait disparaître avec la résolution de l'anémie.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE QUARANTE CAS D'ANEMIES IMMUNOLOGIQUES CHEZ LE CHIEN

Introduction et buts de l'étude

Les affections pouvant s'accompagner d'une anémie immunologique sont fréquentes, certaines sont bien connues alors que d'autres sont régulièrement citées dans la littérature sans que la preuve de leur implication ne soit effectivement bien étayée. Parmi les affections sous-jacentes dont le rôle n'est pas clairement déterminé lors de la survenue d'anémies immunologiques, on trouve le groupe des maladies infectieuses liées à des agents bactériens du groupe des Rickettsies au sens large (ehrlichioses et rickettsioses *sensu stricto*) et les bartonelloses.

L'anémie constitue, en effet, un signe d'appel fréquemment mentionné lors de maladies vectorielles dues à ce type d'hémopathogènes. Plusieurs auteurs, comme nous l'avons vu dans la première partie recommandent, en effet, d'inclure ces affections dans le diagnostic différentiel des causes sous-jacentes d'anémie immunologique. Toutefois, aucun consensus n'existe actuellement sur le sujet, et tous les auteurs ne sont pas d'accord quant à l'origine possible de l'anémie rencontrée lors de rickettsiose.

Il est admis, en France, que l'exclusion d'une babésiose doit être systématiquement entreprise sur la base de l'examen du frottis sanguin lors d'anémie hémolytique. Cependant, l'implication d'autres agents doit être aujourd'hui plus largement envisagée. Les principales rickettsies pathogènes pour le chien et retrouvées en France incluent *Ehrlichia canis, Anaplasma phagocytophilum* et *Anaplasma platys*. Les bartonelles, ainsi que des agents appartenant à la famille des *Rickettsiae* (*Rickettsia rickettsii)* pourraient également être impliqués.

Notre étude a pour but d'évaluer l'incidence des agents pathogènes suscités lors d'anémies immunologiques.

Chapitre I : Matériel et méthode

I. Sélection des cas et échantillons

A. Provenance des animaux

Les différents cas présentés dans cette étude correspondent à des chiens dont les analyses hématologiques et cytologiques ont été interprétées au laboratoire d'Immunologie et Hématologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (ENVL), de septembre 2005 à avril 2007.

La majorité des animaux a été examinée et hospitalisée à l'ENVL. Certains cas ont, cependant, été recrutés dans des cliniques privés sélectionnées en région Rhône Alpes et ayant une clientèle relativement importante.

B. Recueil et organisation des données

Pour les animaux examinés à l'ENVL, les données épidémiologiques, cliniques et

hématologiques ont été recherchées dans les dossiers médicaux.

Pour les animaux examinés par les vétérinaires praticiens, les données nécessaires ont été collectées par l'intermédiaire d'un questionnaire *(cf. annexe 2)* envoyé aux vétérinaires participant à l'étude. Dans ce groupe, seuls les cas correspondant à des questionnaires présentant un nombre suffisant d'informations ont été conservés.

1. Données épidémiologiques

Pour chaque cas, la race, l'âge et le sexe de l'animal sont rapportés. L'objectif de ce recensement est de mettre en évidence une éventuelle prédisposition raciale, de sexe ou d'âge vis-à-vis des anémies immunologiques et de confronter cela aux données de la littérature.

En ce qui concerne la **race**, les chiens de race « définie » sont différenciés des chiens de race « non définie » Le groupe des chiens de race « définie » est ensuite divisé en quatre catégories : petites races (moins de 10 kg), races moyennes (10 à 25 kg), races de grande taille (25 à 45 kg) et races géantes (plus de 45 kg).

En ce qui concerne l'**âge**, trois tranches d'âge sont distinguées : les chiens de moins de 2 ans correspondant aux animaux jeunes, les chiens entre 2 et 8 ans correspondant aux animaux adultes et les chiens de plus de 8 ans correspondant aux animaux âgés. Cette classification animaux jeunes/adultes/âgés est critiquable sur un point ; en effet, elle n'est basée que sur l'âge des animaux et ne tient pas compte des différences de races (les chiens de petite taille ayant des espérances de vie beaucoup plus longues que les chiens de grande taille).

Le recueil de l'anamnèse et des commémoratifs des chiens sélectionnés pour l'étude a également été entrepris, non seulement pour éliminer l'hypothèse d'une origine non immunologique de l'anémie, mais également afin de mettre en évidence un éventuel élément déclencheur ou une autre affection préexistante responsable d'une AHMI secondaire.

2. Données cliniques

Le motif de consultation, les principaux signes cliniques et les résultats des analyses urinaires (si celles-ci ont été réalisées) sont rapportés.

3. Groupe « témoin »

Un groupe « témoin » est également constitué afin de servir de population de référence, en particulier pour les données épidémiologiques. Il est constitué des chiens présentés à la consultation à l'ENVL, quel qu'en soit le motif, sur la même période que la durée de l'étude, soit de septembre 2005 à mars 2007. Les chiens présentés uniquement pour une vaccination ne sont pas pris en compte dans ce groupe témoin. Cette population de référence compte 7 160 chiens.
Les données concernant les caractéristiques de la population de référence sont recensées dans les annexes 8 à 10.

C. Critères de sélection

Quelle que soit la provenance des cas, la sélection s'est effectuée sur la base des

critères suivants :

1. La mise en évidence d'une **anémie**, correspondant dans l'espèce canine à un taux d'hémoglobine inférieur à 12 g/dL.

2. La mise en évidence d'une anémie de **mécanisme immunologique**.
Le caractère immunologique étant défini par :

- ***Un TCD à chaud ou à froid positif, le seuil de positivité dans notre étude étant fixé à 1/8,***
- ***Et/ou la présence sur le frottis sanguin d'une auto-agglutination,***
- ***Et/ou la présence sur le frottis sanguin d'une sphérocytose.***

Ces deux premiers critères constituent des **critères stricts** d'inclusion dans l'étude.

Un certain nombre de critères annexes a également été défini.

3. Critères annexes

■ Les anémies dont le caractère **hémolytique** est avéré sont privilégiées, qu'une cause soit identifiée ou non, notamment sont inclus les cas de babésiose. Le caractère hémolytique est défini essentiellement par des critères cliniques et/ou biologiques favorables, à savoir la présence de :

- ictère,
- bilirubinurie/bilirubinémie augmentée,
- hémoglobinurie,
- splénomégalie et/ou hépatomégalie.

Dans notre étude, les éléments recherchés sont donc :

o un **ictère** : il est recherché lors de l'examen attentif de toutes les muqueuses accessibles de l'animal, son intensité est quantifiée de façon subjective.

o une **bilirubinurie** : elle est mise en évidence grâce à la réalisation de bandelettes urinaires. Elle est évaluée de façon semi quantitative (+ à +++). Seules des bilirubinuries importantes (++) constituent un critère de suspicion d'hyperhémolyse. Chez le chien normal, pour une densité urinaire normale, il est, en effet, fréquent d'observer des traces de bilirubine dans les urines puisqu'il existe une conjugaison rénale d'une fraction de la bilirubine non conjuguée et une élimination urinaire. Ainsi, la présence d'une bilirubinurie à une croix doit être considérée comme normale pour une densité urinaire à 1.020 – 1.030, cela étant retrouvé chez plus de 60% des chiens sains.

o Une **bilirubinémie augmentée** : elle est évaluée de manière quantitative, grâce à des dosages biochimiques réalisés à partir de prélèvements sanguins.

o Une **splénomégalie et/ou hépatomégalie** : elles sont mises en évidence par palpation abdominale et/ou grâce à la réalisation d'examens d'imagerie.

■ Les anémies **périphériques**, donc **régénératives** par définition sont privilégiées.

■ Les anémies pour lesquelles une origine non immunologique est évidente ne sont pas prises en compte. Notamment, sont exclues les anémies inflammatoires, les anémies faisant suite à une hémorragie, les cas d'intoxications aux anti-coagulants, les anémies rencontrées lors d'insuffisance rénale chronique…

D. Prélèvements biologiques

Pour chaque animal, est prélevé :

- du sang sur **tube sec** pour la réalisation des sérologies et du TCI ;

- du sang sur **EDTA** pour l'étude des paramètres hématologiques de base, du TCD et les analyses de biologie moléculaire (PCR).

Dans le protocole, le recueil de 5 mL de sang pour chaque tube est requis, avec au minimum 2 mL par tube, malheureusement ces quantités ne sont pas toujours disponibles pour chaque cas et varient en fonction du manipulateur.

Dans l'attente de la réalisation des différents examens complémentaires, le sang est congelé dans des tubes de cryocongélation.

La récolte du sang doit se faire si possible avant tout traitement, dans le cas échéant, les traitements reçus (nom de la molécule, durée, posologie) sont recensés.

Dans la mesure du possible, les prélèvements sont acheminés immédiatement au laboratoire. Si cela est impossible, les tubes sont stockés à + 4°C, un frottis sanguin est réalisé et séché à l'air libre, non coloré et stocké à l'abri de la lumière, de l'humidité et d'éventuelles vapeurs de formol.

II. Hémogramme

A. Hémogramme de base

1. Paramètres mesurés par l'automate

Pour chaque animal sont prises en compte les valeurs de l'hémogramme (rouge, blanc et plaquettaire) réalisé lors de la présentation de l'animal, indépendamment de la technique utilisée :

- **Taux d'hémoglobine** (Hb) en g/dL ;
- **Hématocrite** (Ht) en % ;
- **Nombre de globules rouges** (GR) par mm^3 de sang ;
- **Index érythrocytaires**, c'est-à-dire le VGM exprimé en fl, la TCMH exprimée en pg et la CCMH exprimée en g/dL. Ces index permettent de caractériser l'anémie ;
- **Nombre de leucocytes** par mm^3 de sang ;
- **Nombre de plaquettes** par mm^3 de sang.

2. Valeurs de référence du laboratoire et interprétation

L'analyseur d'hématologie du laboratoire de l'ENVL est un *Vet abc*©.
Les valeurs de référence du laboratoire sont recensées en *annexe 1*.

2.1.Lignée érythrocytaire

Une anémie est définie par un **taux d'hémoglobine** inférieur à 12 g/dL.
La sévérité de l'anémie peut être qualifiée d'après le taux d'hémoglobine.

Taux d'hémoglobine (en g/dL)	**10-12**	**6-10**	**4-6**	**<4**
Sévérité anémie	discrète	modérée	grave	Très grave

L'anémie est caractérisée grâce aux index érythrocytaires :
- l'anémie est considérée comme **macrocytaire** si le VGM est supérieur à 77 fl et **microcytaire** s'il est inférieur à 60 ;
- l'anémie est considérée comme **normochrome** si le TCMH et le CCMH sont dans les valeurs usuelles, **hypochrome** si ces paramètres sont inférieurs.

2.2.Lignée leucocytaire

Dans l'espèce canine, les valeurs usuelles sont de 6 000 à 17 000 leucocytes/ mm^3 de sang. Les leucopénies sont définies par un nombre de leucocytes inférieur à 6000/ mm^3 et les leucocytoses par un nombre de leucocytes supérieur à 17 000/ mm^3. Les leucocytoses dites importantes correspondent aux cas où le nombre de leucocytes est supérieur à 30 000/ mm^3.

2.3.Lignée plaquettaire

Dans l'espèce canine, les valeurs usuelles sont de 200 000 à 500 000 thrombocytes/mm^3 de sang. Lorsque le nombre de plaquettes est supérieur à 500 000, on parle de thrombocytose. Les thrombopénies sont définies par un nombre de plaquettes inférieur à 200 000/ mm^3.

Plusieurs catégories de thrombopénie sont définies en fonction de la sévérité :
- les thrombopénies sévères (nombre de plaquettes inférieur à 50 000/ mm^3)
- les thrombopénies modérées (nombre de plaquettes compris entre 50 000 et 100 000/ mm^3)
- les thrombopénies légères (nombre de plaquettes compris entre 100 000 et 200 000/ mm^3)

Remarque : les valeurs concernant la lignée plaquettaire indiquées dans les tableaux annexes correspondent aux valeurs corrigées d'après la lecture du frottis sanguin (et non aux valeurs mesurées par l'automate sauf si les deux concordent).

B. Réticulocytes

La **réticulocytose absolue** (nombre de réticulocytes par mm^3 de sang) est déterminée à partir d'un comptage manuel des réticulocytes sur un frottis sanguin coloré au bleu de Crésyl brillant. Ceci permet de différencier les anémies arégénératives des anémies régénératives. L'anémie est considérée comme arégénérative s'il y a moins de 60 000 réticulocytes par mm^3 de sang.

C. Examen du frottis sanguin

Pour chaque cas, un frottis sanguin est réalisé et coloré au May-Grünwald-Giemsa.

■ Il permet d'établir la **numération blanche et l'estimation de la numération plaquettaire**.
La numération blanche est établie dans chaque cas par un comptage manuel lors de la lecture du frottis sanguin et l'estimation de la numération plaquettaire par l'automate est vérifiée.

■ L'examen du frottis sanguin permet également de rechercher systématiquement, au grossissement 400 puis à l'immersion :

1 Des **hémoparasites**, notamment la présence de piroplasmes dans les globules rouges, de morulas d'*Ehrlichia/Anaplasma* ou d'inclusions dans les monocytes, les granulocytes et les thrombocytes ;

2 Des signes en faveur d'une anémie régénérative, en particulier une polychromatophilie ou la présence d'érythroblastes ;

3 Des signes en faveur d'une anémie immunologique, à savoir la présence d'une **auto-agglutination** sur lame et/ou **d'une sphérocytose** majeure.

Remarque : toutes les auto-agglutinations sont différenciées des « rouleaux formation » par ajout d'une goutte de sérum physiologique sur la lame. La sphérocytose n'est signalée que si elle est majeure, c'est-à-dire si elle est supérieure à 50% des globules rouges totaux.

■ Les autres éléments signalés incluent : une « rouleau formation », la présence d'une anisocytose érythrocytaire, la présence de contingents de cellules atypiques comme par exemple des lymphocytes à grand cytoplasme granuleux ou basophile, la présence de monocytes, la présence de GR de forme anormale (écchinocytes, acanthocytes), la présence de corps de Howell Joly...

III. Analyses en immuno-hématologie

A. Tests de Coombs

L'objectif est de mettre en évidence le caractère immunologique de l'anémie, en particulier si aucune auto-agglutination et/ou sphérocytose n'est mise en évidence à l'examen du frottis sanguin.

1. TCD à chaud

1.1.Réalisation

Le TCD à chaud est réalisé de façon systématique sauf si une quantité insuffisante de sang est disponible ou si le prélèvement est trop hémolysé.

1.2.Technique

i. Prélèvements

Le sang est prélevé sur tube EDTA. Le TCD est réalisé le plus tôt possible, en pratique dans les deux heures suivant le prélèvement.

ii. Lavage et centrifugations

Les GR du patient sont d'abord lavés dans une solution saline tamponnée (PBS isotonique).

Dans notre étude, trois lavages successifs sont réalisés. Le lavage consiste à ajouter une solution de PBS à l'échantillon sanguin, puis le tout est mis à centrifuger durant 10 minutes à

2000 tours par minute et à 22°C. Le sérum est retiré et deux autres lavages sont réalisés de la même façon.
Puis 4,9 ml de la solution de PBS isotonique est placé dans un tube auquel est ajouté 0,1 ml de l'échantillon préparé. Ceci permet d'obtenir 5 ml d'une suspension érythrocytaire à 2%.

iii. Dilution du réactif de Coombs

-Tous les puits sont remplis avec 50 µl de PBS ;
-50 µl d'antiglobuline *(Canine Anti-Globulin Reagent, MP Biomedicals SA)* est pipeté et placé dans le deuxième puit (correspondant à la dilution 1/2), le tout est bien mélangé.
-50 µl du puit précédent mélangé est prélevé et placé dans le puit suivant (correspondant par conséquent à la dilution 1/4) et ainsi de suite jusqu'à la dilution 1/128. Ces étapes permettaient d'obtenir un réactif aux dilutions de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, et 1/128. Si la réaction est positive au 1/128, des dilutions supplémentaires sont réalisées selon le même principe.

iv. Mise en contact des GR du patient et de l'anti-sérum

50 µl de la suspension érythrocytaire à 2% est placée dans chaque puit. Le tout est mélangé doucement et mis à incuber 30 minutes à + 37°C.

v. Lecture

La lecture de l'agglutination se fait à l'œil nu et l'intensité de la réaction est quantifiée. Le titre correspond à la dilution de l'antisérum entraînant une réaction positive.

vi. Utilisation de témoins

Un témoin négatif est réalisé. En effet, il n'y a pas d'antiglobuline dans le premier puit afin de vérifier que les GR du malade ne s'auto agglutinent pas spontanément, en l'absence d'antiglobuline.

2. TCD à froid

2.1.Réalisation

La réalisation du TCD à froid dépend de la date d'inclusion dans l'étude. En effet, pour les premiers prélèvements collectés, celui-ci n'a pas été réalisé alors qu'il l'a été systématiquement par la suite.

2.2.Technique

La technique est similaire à celle décrite pour le TCD à chaud mais après prélèvement, les hématies sont conservées 12 heures à + 4°C puis lavées à froid (milieu salin à + 4°C) et centrifugées à froid. L'incubation des hématies a lieu avec l'anti-globuline à + 4°C et non à + 37°C.

3. TCI

3.1.Réalisation

La réalisation du TCI est principalement guidée par la disponibilité en sérum, la technique étant très consommatrice de ce dernier.

3.2. Technique

Le sang du malade est prélevé sur **tube sec** puis centrifugé, ce qui permet de récupérer le sérum du malade.
Des globules rouges d'un chien sain sont lavés trois fois selon le même principe que pour le TCD puis ils ont mis en suspension dans une solution de PBS à 2%.
500 µL de **sérum** à tester sont mis à incuber avec 200 µL de la suspension de GR lavés et 300 µL de PBS dans une étuve à 37°C pendant 30 minutes. Trois autres lavages sont ensuite effectués toujours selon le même principe.
Des dilutions sont ensuite réalisées et on procède comme pour un TCD, c'est-à-dire qu'une fois que les auto-anticorps du sérum du chien malade se sont fixés sur les GR sains, on soumet ces complexes GR/Ac à un antisérum polyspécifique.
Le seuil de positivité est fixé à ¼ dans notre étude.

B. Dosage des anticorps anti-nucléaires

Les anticorps anti-nucléaires (Acan) sont recherchés, en particulier pour identifier une affection lupique associée à l'anémie immunologique. Leur recherche est essentiellement guidée par un contexte épidémiologique et/ou clinique évocateur.
Leur dosage est effectué au laboratoire d'Immunologie et Hématologie de l'ENVL par une technique d'immunofluorescence indirecte sur cellules Hep2.

C. Myélogramme

Un myélogramme est systématiquement réalisé pour les anémies arégénératives ou à caractère régénératif fluctuant. La lecture du myélogramme a lieu au laboratoire d'Hématologie et Cytologie de l'ENVL.

L'examen du myélogramme permet de rechercher trois anomalies principales :

- des **anomalies de nombre** : hyperplasies ou hypoplasies ;
- des **anomalies morphologiques**, en particulier des signes de dysplasie ;
- la présence de **populations cellulaires accessoires** en proportion anormale : monocytoses, lymphocytoses, plasmocytoses et histiocytoses médullaires.

IV. Mise en évidence des agents bactériens

Les agents impliqués dans les rickettsioses au sens large existant en France sont recherchés, à savoir *Ehrlichia canis, Anaplasma phagocytophilum* et *Anaplasma platys.*
Les bartonelles *(Bartonella henselae, Bartonella vinsonii)* et les bactéries de la famille des *Rickettsiae* (*Rickettsia rickettsii)* sont également recherchées.
Cela correspond à l'objet même de l'étude, dont le but est d'évaluer l'incidence des maladies bactériennes vectorielles suscitées lors d'anémie immunologique chez le chien.

A. Lecture du frottis sanguin

L'examen microscopique du frottis sanguin coloré au May-Grünwald-Giemsa est réalisé de façon systématique afin de rechercher de façon directe *E. canis, A. phagocytophilum et A. platys.*
- *E. canis* se présente sous forme de morulas basophiles ou de corps d'inclusion (granules

sphériques) dans le cytoplasme des cellules mononucléées;
- *A. phagocytophilum* se présente sous forme d'inclusions granulocytaires (dans les granulocytes neutrophiles et éosinophiles);
- *A. platys* se présente sous forme d'inclusions plaquettaires.

B. Technique de biologie moléculaire

1. Rappels

La PCR ou « polymerase chain reaction » est une technique d'amplification moléculaire *in vitro*, elle conduit à une amplification sélective d'une séquence d'ADN double brin à partir d'un couple d'amorces nucléotidiques (ou « primers ») s'hybridant de part et d'autre de cette séquence. On obtient un « amplifiat ». La méthode est spécifique car les amorces correspondent à des séquences nucléotidiques précises. La méthode est également très sensible puisque l'amplification permet de détecter le génome d'un agent pathogène dans un échantillon même si celui-ci est très peu représenté (dans une certaine limite toutefois !) mais il faut être rigoureux pour éviter toute contamination.

Dans notre étude, les amorces utilisées permettent d'amplifier une séquence **d'ARN ribosomal 16 S**, présent chez toutes les bactéries. La séquence du gène correspondant est connue pour près de 4000 souches et est accessible par interrogation de bases de données *(GenBank, EMBL).*

2. Etapes

2.1.Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait à partir de 100µl de **sang total** après centrifugation du sang congelé (2000 tours/minute, 20 minutes).

Pour cela, dans un premier temps, les cellules sont lysées par mise en contact avec un tampon de lyse de la protéinase K (*Macherey Nagel©,* France) 15 minutes au bain-marie à 70°C. La purification de l'ADN est ensuite réalisée sur colonne selon les procédures du fabricant avec le kit *NucleoSpin Blood QuickPure © (cf. annexe 3).*

La présence d'ADN après extraction (volume final de l'extrait : 100 microlitres) est vérifiée, par dépôt sur gélose sous ultra-violet de l'extrait en présence de bromure d'éthidium.

2.2.Amplification moléculaire

Les différents agents précités sont recherchés en utilisant des amorces spécifiques.

- Recherche de ***Rickettsia* spp** : la recherche s'effectue par une PCR simple avec amorces spécifiques des *Rickettsia* du groupe des fièvres boutonneuses *(cf. annexe4).*
- Recherche de ***Ehrlichia/Anaplasma spp*** : la recherche de ces agents s'effectue en deux étapes successives, on parle de « PCR emboîtée » ou « nested PCR », cette technique utilise deux couples d'amorce différents, le second couple liant des séquences situées à l'intérieur du premier amplifiat.
  - La première étape consiste en une PCR simple avec des amorces

amplifiant l'ARN ribosomal 16S d'un large spectre d'*Ehrlichia/Anaplasma spp* (dont *E. canis, A. phagocytophilum,...*) *(cf. annexe 5)* ;

- La deuxième étape consiste en une PCR emboîtée pour la recherche spécifique *d'A. phagocytophilum* (*cf. annexe 6).*

❖ Recherche de ***Bartonella*** : la recherche consiste en la combinaison d'une PCR simple (gène gltA/ Citrate syntase) et d'une PCR **semi emboîtée** (ARN 16S) *(cf. annexe 7).*

La préparation du mélange pour la PCR a été réalisée de la même manière pour toutes les PCR. Dans un tube *Eppendorf*© sans RNAse ni DNAse, on ajoute :

-10 µl de tampon *ExTaq*©,

- 8 µl de mélange de *dNTP* 2,5 mM,

- 1 µl de chaque amorce à la concentration de 50 ng /µl

- et au dernier moment, 0,5 µl de Taq polymérase *Takara Ex Taq*© (*Takara Biomediacls, Japon*) à 5 UI/µl.

Le volume de 100 µl est obtenu en rajoutant la quantité nécessaire d'eau dé ionisée ; puis 20 µl de ce mélange sont additionnés à 5 µl de l'échantillon contenant l'ADN purifié et l'amplification peut avoir lieu.

2.3.Identification

Le produit amplifié par PCR est hybridé avec une sonde spécifique déposée sur un support de type nitrate de cellulose, puis révélé. S'il y a amplification, la taille de l'amplifiat et la spécificité des amorces sont une bonne indication de la présence de l'agent recherché. Toutefois, dans un second temps, un séquençage de l'amplifiat est réalisé et celui-ci est analysé par comparaison avec des banques de données.

C. Sérologies

Dans notre étude, sont effectuées :

- Des sérologies pour rechercher des anticorps anti-*E. canis* à l'ENVL

- Des sérologies pour rechercher des anticorps anti-*A. phagocytophilum* à l'ENVA (laboratoire de Bactériologie du Professeur Boulouis).

1. Rappels

Il n'existe actuellement pas de techniques sérologiques disponibles pour la recherche d'anticorps contre *A. platys* et *R. rickettsii*. Pour *A. platys,* un diagnostic sérologique par immunofluorescence indirecte existe, toutefois l'impossibilité actuelle de cultiver *A. platys in vitro* implique de maintenir en permanence des chiens infectés pour assurer ce diagnostic, si bien que peu de centres d'analyse sont susceptibles d'offrir cette analyse (*Beaufils 2004*). Il existe, toutefois, pour *A. platys* des réactions sérologiques croisées avec *A. phagocytophilum.*

2. Techniques

Les sérums ont été testés par immunofluorescence indirecte, qui demeure actuellement la méthode de référence.

2.1.Recherche d'anticorps anti- E. canis

Ces analyses ont été effectuées au laboratoire d'Immunologie et Hématologie de l'ENVL.

a. Principe

Les sérums dilués sont mis en contact de cellules préalablement infectées par la bactérie *E. canis* inactivée par le formol (antigène *ehrlichia canis* de chez SYNBIOTICS, lot 06EHRAGF06) immobilisées sur des lames 18 puits. Pour ce faire, la suspension cellulaire est diluée au demi en PBS/BSA (bovine serum albumine) 0,5 % et 10 µL de cette préparation sont déposés sur chaque puit. Les lames sont ensuite séchées une nuit à température ambiante puis fixées 15 minutes par immersion en acétone à – 20°C. Le titrage des anticorps s'effectue alors par immunofluorescence indirecte, à l'aide d'un conjugué d'anticorps de mouton dirigés contre les chaînes lourdes et légères d'IgG de chien, marqué à la fluorescéine *(sheep anti-dog IgG (H+L) FITC , The Binding Site, ref PF 230).*

b. Manipulations

Les sérums testés sont d'abord dilués au 1/10ème en PBS dans des tubes à hémolyse : 40 µL de sérum est additionné à 360 µL de PBS. Un témoin positif est systématiquement ajouté aux sérums à tester, dans chaque série. Puis les dilutions successives au demi sont réalisées en plaques de 96 puits : 1/20-1/40-1/80-1/160-1/320-1/640.
20 µL de chaque dilution sont déposés sur chacun des puits ; les lames sont ensuite mises à incuber 30 minutes à 37°C en chambre humide puis lavées 10 minutes en bain de PBS.
Le conjugué est préparé en quantité suffisante dans un tube à hémolyse dans les proportions suivantes :
-50 µL de *sheep anti-dog IgG FITC*
-950 µL de PBS
-10 µL de Bleu Evans à 1%
20 µL de cette préparation sont déposés dans chaque puit et les lames sont à nouveau placées pour 30 minutes en chambre humide.
Deux lavages de 5 minutes en PBS sont ensuite effectués avant de sécher les lames et de les monter au glycérol.

c. Lecture

La lecture se fait ensuite au microscope à fluorescence (objectif 40) : le titre du sérum est défini comme l'inverse de la dernière dilution présentant une fluorescence significative.
Le seuil de positivité est fixé dans notre étude à un **titre supérieur ou égal à 80**.

2.2.Recherche d'anticorps anti-A. phagocytophilum

Ces analyses ont été effectuées au laboratoire de Bactériologie de l'ENVA (Pr Boulouis).

a. Technique

La technique est similaire à celle décrite précédemment pour la sérologie *E. canis*.

Les sérums testés sont d'abord dilués au 1/50ème en PBS isotonique (pH 7,2). Puis des dilutions successives au demi sont réalisées en plaques comme précédemment. 20 µL de chaque dilution sont déposés sur chacun des puits des lames d'antigènes (*MegaScreen Fluoanaplasma ph/ MegaCor, Horbranz, Autriche*) ; les lames sont ensuite mises à incuber 30 minutes à 37°C en atmosphère humide puis lavées deux fois cinq minutes en bain de PBS sous agitation. Le conjugué est alors préparé : sérum de chèvre anti IgG (H+L) de chien marqué à la fluorescéine dilué au 1/50 dans une solution de Bleu Evans au 1/100. 20 µL de cette préparation sont déposés dans chaque puit puis les lames sont à nouveau placées 30 minutes en chambre humide. Deux lavages de cinq minutes en PBS sont ensuite effectués avant de sécher les lames. Des lamelles sont apposées sur les lames (*fluoprep©, Biomérieux*).

b. Lecture

La lecture se fait à l'immersion sous une lampe UV 50 watt.

Le seuil de positivité est fixé dans notre étude à un **titre supérieur ou égal à 50**.

V. Autres examens complémentaires

En fonction des cas, d'autres examens complémentaires sont réalisés pour permettre d'identifier une affection pouvant être associée aux anémies immunologiques. La réalisation de ces examens complémentaires est principalement guidée par les données cliniques et anamnestiques et varie en fonction du cas.

A. Recherche d'autres maladies infectieuses

- Recherche du **statut leishmanien** par des techniques sérologiques (immunofluorescence indirecte) ou de biologie moléculaire (PCR).
- Recherche du statut en anticorps vis-à-vis de la **leptospirose** par des techniques sérologiques (laboratoire Scanelis, Toulouse, recherche de différents sérovars)
- Recherche du statut en anticorps vis-à-vis de la **borréliose** par des techniques sérologiques.
- Recherche du statut en anticorps vis-à-vis de la **babésiose, néosporose et herpesvirose.**

B. Dosages biochimiques

Différents dosages biochimiques sont réalisés en particulier pour évaluer les répercussions sur les principaux organes de l'anémie et/ou de l'affection en cours.

Les dosages sont effectués au laboratoire de biochimie de l'ENVL pour les animaux présentés à la consultation de l'ENVL ou les résultats nous sont communiqués par le vétérinaire traitant si l'animal n'est pas examiné sur le site.

Chapitre II : Résulats et discussion

Quarante cas d'anémie immunologique répondant à nos critères de sélection ont été recensés.

I. Caractéristiques épidémiologiques

L'étude épidémiologique est réalisée sur les 40 cas de l'étude.
Les résultats sont exposés en *annexe 11*.

Cas	Race	Age	Sexe	Cas	Race	Age	Sexe
1	Croisé	9,5	M	**21**	Doberman	8,5 m	M
2	Beagle	5	M	**22**	Croisé	9	F
3	Croisé	14	M	**23**	Braque portugais	10	M
4	Beauceron	6 m	M	**24**	Cavalier King Charles	10	M
5	Labrador	2	F	**25**	Chien de berger	10	M
6	Labrador	12	M	**26**	Léonberg	5	F
7	Teckel	10	M	**27**	Braque allemand	12	F
8	Labrador	12	F	**28**	Beauceron	6	F
9	Rottweiler	6	M	**29**	Setter anglais	1,5	F
10	American Staffordshire terrier	2	M	**30**	Dogue allemand	1	M
11	Labrador	3	M	**31**	Braque français	8	F
12	Beagle	9	M	**32**	Berger des Pyrénées	3	F
13	American Staffordshire terrier	2	M	**33**	Bouledogue français	4	M
14	Springer spaniel	3	F	**34**	Croisé	12	F
15	Coton de tuléar	12	F	**35**	Bichon	5	M
16	Berger allemand	2,5	M	**36**	Labrador	9	F
17	Caniche	14	F	**37**	Golden retriever	10	F
18	Shar peï	9	M	**38**	Croisé	1,5	M
19	Berger allemand	8	M	**39**	Doberman	4	F
20	Bouvier bernois	6,5	M	**40**	Bichon	12	M

M : mâle, F : femelle, Age en années sauf précision m : mois

Tableau 9 : Données épidémiologiques pour les 40 cas de l'étude

A. Influence de la race

Parmi les 40 cas étudiés, les anémies immunologiques touchent des races diverses, avec une nette prédominance pour les animaux de **race « définie ».** En effet, seuls 5 cas correspondent à des chiens « croisés ». Les races les plus représentées sont : les labradors (5 cas soit 12,5 %) et les braques (3 cas soit 7, 5 %).

Parmi les 35 chiens de race « définie », 17 chiens appartiennent à des races de grande taille, alors que 7 appartiennent à des petites races, 7 à des races moyennes, et 5 à des races géantes. La majorité des chiens de race « définie » appartiennent donc à des **races de grande taille** (48,6%).

Catégorie de la race	Petite taille < 10 kg	Taille moyenne 10-25 kg	Grande taille 25-45 kg	Race géante > 45 kg	Total
Nombre de cas	6	7	17	5	35
Pourcentage	17	20	49	14	100

Tableau 10 : Répartition en fonction de la taille pour les 35 chiens de l'étude de race "définie"

Dans la population de référence (*cf. annexe 8*), les labradors constituent également la race la plus représentée (692 labradors sur 7 160 chiens, soit 9,7%), ceci peut expliquer la forte prévalence de cette race retrouvée dans notre étude. Au contraire, les braques sont peu représentés dans le groupe témoin. Les chiens de race « non définie » sont en nombre similaire dans le groupe témoin et dans notre étude, représentant respectivement 8,3 et 12,5% des cas.

Par ailleurs, parmi les 22 races les plus représentées (qui regroupent toutes plus de 1% de chiens par rapport au nombre total d'animaux), on trouve majoritairement des petites races (10) alors que les grandes races sont moins représentées. Dans notre série, les chiens de grande race sont donc bien prédominants, sans que cela ne soit influencé par le recrutement.

Aucune analyse statistique comparative n'est possible entre la population de l'étude et la population de référence en raison du nombre restreint de cas dans la population de l'étude (effectif par race inférieur à 5, test du chi2 non applicable).

Les races citées dans la littérature comme étant prédisposées aux anémies immunologiques, en particulier le cocker, mais aussi le caniche, le colley et le bobtail ne sont pas retrouvées dans notre étude, toutefois cette prédisposition raciale ne fait pas l'objet de consensus et varie selon les auteurs et les lieux géographiques. Les principales études disponibles étant anglo-saxonnes, il existe très peu de données concernant les prédispositions raciales en France. En effet, les cockers, par exemple, qui sont bien représentés outre-atlantique, ne sont que peu retrouvés dans la population de référence. Il en est de même pour les bobtails et colleys, seuls les caniches se classent dans le trio de tête des races les plus présentées à la consultation à l'ENVL.

B. Influence de l'âge

L'âge moyen des chiens de l'étude est de **6,9 ans**, avec une fourchette de 6 mois à 14 ans. Ceci est légèrement plus élevé que dans la population de référence dans laquelle l'âge moyen des chiens est de 5,6 ans.

Dans la série, les animaux atteints sont principalement des animaux adultes et âgés, avec des chiffres similaires entre les deux classes. Les animaux jeunes sont par contre très peu représentés avec seulement 12,5 % des cas. Ceci est légèrement différent de ce que l'on observe dans la population de référence. En effet, dans celle-ci, les classes « chien adulte » et « chien âgé » représentent respectivement 38,4 et 32,1 % des cas, alors que la classe « animaux jeunes » ne représente que 24,7 % des cas. Ainsi, dans cette population de référence, la classe « animaux jeunes » est également minoritaire mais elle l'est moins que dans notre étude.

Age en années	< 2	2-8	> 8	Total
Nombre de cas	5	17	18	40
Pourcentage	12,5	42,5	45	100

Tableau 11 : Répartition en fonction de l'âge des 40 chiens de l'étude

Dans la littérature, les chiens atteints d'une AHMI sont majoritairement des **chiens d'âge moyen**. Les chiens qui ont entre 2 et 4 ans, et 5 et 7 ans ont plus de risque de développer l'affection que les chiens de moins de 2 ans. Toutefois, cela concerne essentiellement les AHMI primaires puisque les AHMI secondaires dépendent essentiellement des caractéristiques épidémiologiques de l'affection sous-jacente. Ainsi, l'âge moyen pour les chiens de l'étude pour lesquels aucune cause sous-jacente n'est identifiée est de 8,5 ans dans notre étude. Les chiens âgés sont alors les plus représentés, ce qui ne coïncide pas avec les données de la littérature.

C. Influence du sexe

Dans notre série, 24 mâles (60%) et 16 femelles (40%) sont comptabilisés. Ainsi, une prédominance des **mâles** (60%) est notée, mais il n'existe pas de différence significative entres les deux sexes. Dans la population de référence, les mâles sont également plus nombreux que les femelles puisqu'ils représentent 52 % des cas. Il n'existe pas non plus de différence significative entre la population de l'étude et la population de référence en ce qui concerne la prédisposition sexuelle (test du chi2 = 0,15 au risque de 5%).

Dans la littérature, aucun consensus n'existe actuellement concernant la prédisposition sexuelle.

II. Etude clinique

A. Motifs de consultation

Les différents motifs de consultation sont examinés pour 39 cas et répertoriés dans les *annexes 12 à 16*. Pour le cas 24, le motif de consultation n'est pas connu.

Motif de consultation	Nombre de cas	Pourcentage
Abattement	31	79,5%
Dysorexie/Anorexie	18	46,2%
Pigmenturie	7	18%
PUPD	7	18%
Diarrhée	5	12,8%
Vomissement	4	10,3%
Amaigrissement	4	10,3%

Tableau 12 : Motifs de consultation pour 39 chiens

L'**abattement** (79,5%) constitue le motif de consultation le plus fréquent, suivi par la **dysorexie** et l'**anorexie** (46,2%). Ils se présentent isolés ou associés entre eux ou à d'autres signes. Toutefois, ces symptômes sont très peu spécifiques et représentent des motifs de consultation très fréquents quelle que soit l'affection sous-jacente impliquée.

Notons qu'un signe plus spécifique, la **pigmenturie** constitue le motif de consultation chez 7 chiens, ce qui est un signe d'appel fort d'un phénomène hémolytique en cours. Etant donné le faible seuil d'excrétion urinaire de la bilirubine chez le chien, la bilirubinurie est présente précocement et précède en général l'ictère, ce qui peut être un signe précurseur intéressant de phénomène hémolytique.

La **PUPD** constitue un des motifs de consultation chez 7 chiens, les **troubles digestifs**

(vomissements et diarrhée) chez 9 chiens. Ceci coïncide avec les données de la littérature dans lesquelles ces signes sont parfois rapportés.

Chez un chien (cas 35), une **syncope** constitue le motif de consultation. Ce symptôme peut, en effet, se rencontrer lors d'anémie sévère même s'il s'agit d'un signe rarement observé.

Dans la majorité des cas, les symptômes sont d'apparition brutale d'après les propriétaires et la consultation, chez le vétérinaire traitant ou à l'ENVL, suit rapidement les premiers signes. Toutefois pour 9 cas, l'affection s'installe ensuite selon un mode chronique.

Dans 4 cas, les animaux ont été présentés à la consultation pour l'exploration d'un syndrome autre que l'anémie : exploration de troubles neurologiques (cas 10 et 37), exploration de troubles digestifs (cas 18) et exploration de troubles dermatologiques (cas 21). L'AHMI a dans ce cas été mise en évidence dans un second temps de façon fortuite.

B. Examen clinique des animaux

Cela porte sur les 40 cas de l'étude.
Les données cliniques sont recensées en *annexes 12 à 16*.

Signe clinique	Nombre de cas	Pourcentage
Abattement	31	77,5 %
Muqueuses pâles	24	60 %
Hyperthermie	18	45 %
Souffle cardiaque	12	30 %
Polypnée	8	20 %
Tachycardie	7	17,5 %
Adénomégalie	5	12,5 %
Hypothermie	4	10 %
Douleur abdominale	3	7,5 %
Troubles respiratoires	2	5 %

Tableau 13 : Signes cliniques observés chez 40 chiens

L'**abattement**, signe très peu spécifique constitue là aussi le signe clinique le plus fréquemment observé.

Des **muqueuses pâles** sont observées dans 60 % des cas, cela constitue un signe d'appel de l'anémie. Ce signe constitue toutefois un critère clinique relativement subjectif. Dans les différentes études publiées, ce signe clinique est plus fréquemment rapporté que dans notre étude puisqu' il serait présent dans 76 à 100% des cas.

L'**hyperthermie** est considérée par certains comme un signe d'hyperhémolyse, en particulier intra vasculaire et serait dans ce cas liée à la libération de substances globulaires pyrogènes. Elle peut également être attribuée à une réponse immunitaire importante, et d'après les données de la littérature existerait dans environ la moitié des cas d'AHMI, ce qui est retrouvé dans notre étude. Enfin, elle peut être le résultat d'un phénomène inflammatoire ou infectieux se développant en parallèle de l'anémie ou à l'origine de celle-ci.
Ainsi dans notre étude, une hyperthermie est présente lors de la consultation initiale chez 18 chiens :

- dans 9 cas, elle accompagne un processus infectieux : piroplasmose (cas 2, 8, 16, 30, 38), leptospirose (cas 4), ehrlichiose (cas 29) leishmaniose (cas 39) et prostatite (cas 23) ;
- dans un cas, elle accompagne un processus néoplasique (cas 20, histiocytose systémique) ;
- dans 8 cas, elle se développe parallèlement à l'anémie immunologique sans autre cause identifiée pouvant l'expliquer (cas 7, 15, 17, 18, 22, 32, 35, 36).

Au contraire, chez 4 chiens, une hypothermie est présente lors de la consultation initiale, celle-ci peut traduire l'installation d'un état de choc. En particulier, pour le cas 12, l'animal est présenté en état de choc caractérisé par une hypothermie, une tachycardie, un pouls bondissant et des muqueuses très pâles. Cet état peut s'expliquer par l'installation rapide (en moins de 3 jours) d'une anémie sévère (taux d'hémoglobine inférieur à 3,5 g/dL).

Des **modifications cardio-respiratoires** sont présentes chez environ un quart des chiens de l'étude. Un souffle cardiaque est détecté chez 12 chiens, dans la majorité des cas ce souffle est systolique, de bas grade et surtout audible en région apexienne gauche. Une polypnée est présente chez 8 chiens. Ces deux signes seraient liés à la baisse de la viscosité sanguine. Une tachycardie est décelée chez 7 chiens au moment de l'auscultation initiale, il s'agit d'après les données de la littérature d'une tachycardie compensatrice de la baisse de l'hématose sanguine. Enfin, des troubles respiratoires sont présents chez deux chiens : dyspnée expiratoire pour le cas 12 et inspiratoire pour le cas 23. Pour ces deux cas, la recherche d'une cause sous-jacente pouvant expliquer ces difficultés s'est révélée infructueuse (réalisation de radiographies thoraciques notamment), la présence d'une thrombo-embolie, complication majeure des AHMI, doit donc être considérée. Toutefois, l'incidence des complications cardio-vasculaires et/ou respiratoires liées au syndrome anémique pourrait être sous-estimée dans notre étude, et ce, à cause du mode de recueil des données cliniques. En effet, pour les animaux non examinés à l'ENVL en première intention, seuls les signes cliniques majeurs ont été rapportés par le vétérinaire traitant.

Une **adénomégalie** est observée chez 5 chiens. Dans trois cas, une cause sous-jacente l'expliquant est identifiée : leishmaniose (cas 39), adénite secondaire à une pyodermite profonde (cas 28) et histiocytose systémique (cas 20). Dans deux cas (cas 15 et 23), elle reste inexpliquée. Dans la littérature, une adénomégalie associée à une AHMI est parfois rapportée et pourrait résulter d'une réponse immunitaire vigoureuse.

Une limite lors de la récolte de ces signes cliniques est le manque d'homogénéité. En effet, les chiens de l'étude ont été examinés par différents praticiens, ce qui rend l'interprétation de certains signes subjective. Si les critères recherchés par les praticiens demeurent en général assez constants, cela ne supprime toutefois pas la variabilité liée à l'examinateur et peut introduire un biais dans notre étude. Pour 18 cas, les animaux ont été référés à l'ENVL dans un second temps, les signes cliniques recensés ici sont ceux rapportés par le vétérinaire traitant lors de son examen initial. Dans 6 cas, les analyses hématologiques et cytologiques ont été réalisées à l'ENVL mais les animaux n'ont pas été examinés sur le site.

C. Recherche de phénomènes d'hyperhémolyse

La recherche d'un **ictère** lors de l'examen clinique est réalisée chez les 40 chiens, un ictère est présent chez 17 d'entre eux, soit 42,5 %. Parmi ces 17 chiens, l'ictère est franc chez 9 chiens et il s'agit d'un subictère chez 8 chiens. Toutefois, lors d'anémie immunologique,

l'ictère peut être discret ou absent en particulier dans les formes atténuées ou chroniques, son absence ne doit donc pas constituer un critère d'exclusion d'une AHMI. Par ailleurs, l'appréciation de la présence d'un ictère demeure un critère clinique relativement subjectif qui peut varier selon le praticien, en particulier si l'ictère est peu marqué.

Une **analyse urinaire** est réalisée chez 21 chiens. Les résultats des analyses urinaires sont répertoriés en *annexe 24*.
Une bilirubinurie (2 + ou plus) est présente chez 15 de ces 21 chiens, soit 71,4 % et il n'y a pas de bilirubinurie chez 6 chiens. Par ailleurs, une pigmenturie marquée est rapportée dans quatre cas par le vétérinaire traitant sans que les résultats de l'analyse urinaire ne soient connus plus précisément.
L'interprétation de l'hémoglobinurie est plus difficile. En effet, même s'il existe pour plusieurs chiens de l'étude une hématurie, l'absence de réalisation systématique d'un culot urinaire ne permet pas de différencier la présence de globules rouges ou d'hémoglobine dans les urines. Chez 11 chiens, une hématurie importante est présente (2 + ou plus) et chez 5 de ces chiens, un culot urinaire confirme la présence d'une hémoglobinurie.

Un dosage de la **bilirubinémie** sanguine est réalisé chez 12 des 40 chiens. Elle est augmentée chez 8 chiens et normale chez 4 autres.

La recherche d'une **hépatomégalie** ou d'une **splénomégalie** est réalisée lors de l'examen clinique et éventuellement par la réalisation d'examens d'imagerie. Elles sont mises en évidence cliniquement chez 4 chiens (cas 5, 7, 13 et 19). Elles sont révélées par une échographie abdominale chez 7 chiens, dans 2 cas, cela confirme la suspicion clinique (cas 7 et 19) et dans 5 autres cas, cela n'avait pas été mis en évidence lors de l'examen clinique (cas 11, 20, 32, 36 et 37). Toutefois, pour certains cas, une cause autre qu'une hyperhémolyse permet d'expliquer cette organomégalie : pour le cas 19, un hémangiosarcome peut tout à fait être responsable de la splénomégalie et pour le cas 20, une histiocytose systémique pourrait également l'expliquer.
Une échographie abdominale est réalisée chez 12 autres chiens et ne met pas en évidence d'organomégalie.

Une **hyperthermie** peut également signer la présence d'un phénomène hémolytique. Dans notre étude, elle est présente chez 18 chiens lors de la consultation initiale, et ne reconnaît pas de cause évidente dans 8 cas.

Un diagnostic de certitude d'hyperhémolyse nécessite la présence de plusieurs éléments favorables. En effet, la plupart des critères diagnostiqués cités ci-dessus ne sont pas caractéristiques des phénomènes hémolytiques. Ainsi la présence d'un ictère, d'une bilirubinurie et/ou bilirubinémie et d'une hépatomégalie peut également être provoquée par des affections hépatiques sévères. Par ailleurs, dans certains cas, la détermination avec certitude de l'absence ou de la présence de phénomènes hémolytiques est impossible (pathologies hépatiques associées ou présence d'un nombre insuffisant de critères). Dans 10 cas de l'étude, il n'existe pas au moment de la consultation initiale de signes en faveur d'un phénomène hémolytique. Toutefois, le manque de standardisation lors de la recherche des signes en faveur d'un processus hémolytique pourrait en partie expliquer ceci et ne permet dont pas d'émettre des conclusions significatives. En effet, les critères positifs ne sont pas recherchés de façon systématique. Par exemple, une analyse d'urine n'est réalisée que chez 25 chiens. Or une pigmenturie constitue parfois le seul signe d'un phénomène hémolytique en cours. La recherche de l'existence d'un ictère constitue, comme nous l'avons dit, un critère

clinique relativement subjectif. La majorité des auteurs s'accorde donc à dire qu'un certain nombre d'anémies immunologiques périphériques s'accompagne de peu ou pas de signes en faveur d'une hémolyse en cours.

Cas	Ictère	Pigmenturie	Bilirubinémie	Hépatomégalie Splénomégalie	Cas	Ictère	Pigmenturie	Bilirubinémie	Hépatomégalie Splénomégalie
1	+		+		21				
2		+			22				
3		+			23				
4	+				24	ND	ND	ND	ND
5		+		+	25				
6	+				26				
7	+	+		+	27				
8		+			28		+		
9	+	+			29		+		
10	+	+	+		30		+		
11	+		+	+	31				
12	+	+			32				+
13	+	+		+	33	+	+	+	
14	+	+	+		34		+		
15	+				35	+		+	
16		+			36	+	+		+
17	+				37				+
18					38		+		
19					39	+			
20	+	+	+	+	40				

Tableau 14 : Récapitulatif des signes en faveur d'un processus hémolytique chez les 40 chiens de l'étude

III. Etude hématologique

Les paramètres hématologiques sont recensés dans les *annexes 19 à 21*.

A. La lignée érythrocytaire

Pour chaque animal, ont été recherchées les valeurs suivantes : le taux d'hémoglobine, l'hématocrite et le nombre de globules rouges. Tous les animaux de l'étude présentent, pour ces trois paramètres, des valeurs inférieures aux valeurs de référence, puisque cela correspond au critère même d'inclusion dans l'étude.

Le taux d'hémoglobine moyen des chiens de l'étude a été calculé à partir des valeurs des 40 chiens : il est de **7,3 g/dL** avec une valeur maximale de 11,5 g/dL et une valeur minimale de 2,9 g/dL.

Taux d'hémoglobine (en g/dL)	**10-12**	**6-10**	**4-6**	**<4**
Nombre de cas	8	16	12	4

Tableau 15 : Classification en fonction du taux d'hémoglobine pour les 40 chiens de l'étude

Ainsi dans la majorité des cas, l'anémie est modérée à grave. Elle est très grave dans 4 cas, et discrète dans 8 cas. Ceci coïncide avec les données de la littérature qui rapporte une

anémie de sévérité variable de modérée à sévère lors d'AHMI.

Il existe peu de différence dans le taux moyen d'hémoglobine qu'une cause soit identifiée ou non. En effet, pour les 16 cas pour lesquels une cause sous-jacente a été identifiée, le taux moyen d'hémoglobine est de 8,82 g/dL, alors qu'il est de 6,28 g/dL pour les 24 cas pour lesquels aucune cause sous-jacente n'est identifiée. L'intensité de l'anémie serait ainsi légèrement plus élevée dans les cas primaires.

La **réticulocytose** est connue pour 38 chiens. L'étude concerne essentiellement les anémies périphériques donc régénératives, mais le caractère « régénératif » est inconstant. Il existe, en effet, un temps de latence physiologique de 4 à 5 jours avant que la moelle ne produise des réticulocytes suite à une hémolyse aiguë. Ce délai est théorique et il peut y avoir retard de réponse médullaire au stress hémolytique. Or dans notre étude, pour un certain nombre de cas, les prélèvements ont été réalisés alors que l'affection était en cours depuis moins de 4 à 5 jours.

Lors de la première analyse réalisée à l'ENVL, l'anémie est régénérative dans 19 cas et arégénérative dans 19 cas. Parmi les 19 cas pour lesquels l'anémie est arégénérative :

- l'évolution est inférieure à 5 jours dans 6 cas (délai de latence physiologique avant l'apparition d'une réticulocytose) ;
- le délai d'évolution est inconnu chez 3 chiens ;
- et le délai d'évolution est supérieur à 5 jours chez 10 chiens.

L'évolution du caractère régénératif est suivie pour ces 19 cas. Parmi ceux-ci, l'anémie :

- devient régénérative rapidement chez 3 chiens (cas 16, 30, 38), chez ces animaux l'évolution de l'anémie était rapide et l'absence de réticulocytose devait correspondre au temps de latence physiologique ;
- devient régénérative très tardivement suite à la mise en place d'un traitement immunosuppresseur chez 6 chiens (cas 28, 29, 33, 34, 37, 39) ;
- présente un caractère régénératif fluctuant chez 5 chiens (cas 3, 18, 26, 31, 36).

Pour ces deux derniers cas de figures, une participation centrale ne peut être exclue. Il existe, en effet, pour un certain nombre de cas d'AHMI, une composante centrale qui perturbe l'érythropoïèse et qui modifie par conséquent la réponse réticulocytaire (*May 2003*). Le caractère régénératif ne constitue donc pas un critère d'inclusion strict dans notre étude. Par ailleurs, pour les anémies arégénératives après le délai de latence ou présentant une régénération fluctuante, un myélogramme a systématiquement été réalisé afin d'exclure une autre cause d'anémie centrale.

Dans 5 cas, aucun suivi de l'animal n'est possible ou une euthanasie survient avant l'apparition d'une réticulocytose significative.

Les **paramètres érythrocytaires** sont connus pour 38 chiens (pas de données pour les cas 1 et 27), ils permettent de caractériser l'anémie. Dans la majorité des cas (29 cas, soit 76,32%), l'anémie est normocytaire normochrome, elle est macrocytaire normochrome chez 9 chiens, tous ces chiens présentant par ailleurs une réticulocytose importante. Le caractère macrocytaire de l'anémie peut alors être expliqué par le nombre important de réticulocytes circulants, de taille supérieure aux globules rouges normaux.

B. La lignée plaquettaire

La synthèse des données concernant la lignée plaquettaire est présentée dans le *tableau 16*.

Anomalies constatées	Nombre de cas	Pourcentage
Thrombopénie	22	55
Thrombocytose	2	5
Aucune	16	40
Total	40	100 %

Tableau 16 : Paramètres de la lignée plaquettaire chez les 40 chiens de l'étude

Une thrombopénie concomitante de l'anémie est présente chez 55% des chiens, ce qui correspond aux données de la littérature.
Cette thrombopénie est sévère chez 6 chiens, modérée chez 4 chiens et légère chez 12 chiens.

Cette thrombopénie reconnaît plusieurs causes :

- Elle pourrait résulter d'une pathologie infectieuse sous-jacente. Ainsi, dans notre étude :
  - chiens présentent une piroplasmose (cas 2, 16, 27, 30 et 38) ;
  - 1 chien présente une leptospirose (cas 4) ;
  - 2 chiens présentent une ehrlichiose à *Ehrlichia canis* (cas 9 et 29) ;
  - et 1 chien présente une piroplasmose et une ehrlichiose (cas 26).

La thrombopénie est une anomalie hématologique classiquement rencontrée au cours de ces trois affections.

- Elle peut accompagner un processus néoplasique : hémangiosarcome (cas 19) ou histiocytose systémique (cas 20).

Pour les cas pour lesquels aucune cause sous-jacente n'est identifiée, une thrombopénie à médiation immune ne peut être écartée, il aurait ainsi pu être intéressant de rechercher les anticorps anti-plaquettes afin d'explorer cette hypothèse, l'association d'une AHMI et d'une thrombopénie à médiation immune étant fréquemment rencontrée (syndrome d'Evans).

Deux chiens présentent une thrombocytose, le cas 34 a reçu un traitement corticoïdes pouvant l'expliquer, le cas 18 n'a pas reçu de traitement.

C. La lignée leucocytaire

La synthèse des données concernant la lignée leucocytaire est présentée dans le *tableau 17*.

Anomalies constatées	Nombre de cas	Pourcentage
Leucocytose	21	52,5
Leucopénie	5	12,5
Aucune	14	35
Total	40	100 %

Tableau 17 : Paramètres de la lignée leucocytaire pour les 40 chiens de l'étude

La majorité des chiens de l'étude présente une **leucocytose** (52,5% des cas), celle-ci

est importante dans 9 cas. Cette donnée est malheureusement difficilement interprétable étant donné la proportion importante de chiens pour lesquels une corticothérapie a été mise en place avant la réalisation des examens hématologiques (10 chiens).

D'après les données de la littérature, une leucocytose neutrophilique est fréquemment observée lors d'AHMI et reconnaît différentes causes, parmi lesquelles :

- une nécrose tissulaire secondaire à l'hypoxie anémique ou à une affection thromboembolique ;
- une influence des cytokines inflammatoires et des composants du complément mis en jeu lors d'AHMI ;
- une stimulation indirecte de la moelle osseuse suite à l'anémie (réaction leucoérythroblastique) ;
- et une diminution de la migration leucocytaire tissulaire observée lors d'AHMI.

Une **leucopénie** est notée chez 5 chiens. Dans 2 cas, elle se développe chez des chiens atteints de piroplasmose et dans 1 cas chez un chien atteint de piroplasmose et d'ehrichiose. Dans les deux autres cas, aucune cause sous-jacente n'est identifiée ; une éventuelle neutropénie à médiation immune, dans le cadre de cytopénies d'origine dysimmunitaire, ne peut être écartée.

D. Lecture du frottis sanguin

La lecture du frottis sanguin est réalisée chez 39 chiens (pas de frottis sanguin disponible pour le cas 28). Les résultats de la lecture du frottis sanguin sont rapportés en *annexe 22*.

■ Des critères en faveur d'une **origine immunologique** de l'anémie sont recherchés, en particulier la présence d'une auto-agglutination et d'une sphérocytose majeure :

- une auto-agglutination et une sphérocytose majeure sont présentes simultanément chez 9 chiens ;
- une auto-agglutination seule est présente chez 3 chiens ;
- une sphérocytose majeure seule est présente chez 8 chiens.

Ainsi, chez 20 chiens, des signes en faveur d'une origine immunologique sont retrouvés, notons que chez 4 de ces chiens, le TCD à chaud a été réalisé et s'est révélé négatif. La sphérocytose résulte de ce qui reste des hématies après phagocytose partielle par des macrophages, cela constitue un argument majeur, bien que non spécifique, en faveur d'une AHMI. Toutefois, les autres causes en faveur d'une sphérocytose (anémie à corps de Heinz, anémie post-transfusionnelle, CIVD, hypophosphatémie, intoxication par le zinc, hémolyse micro-angiopathique) sont exclues dans notre étude sur la base des commémoratifs, de l'examen clinique et des résultats des examens complémentaires. Par ailleurs, seules les sphérocytoses majeures (supérieur à 50% du nombre total de GR) sont signalées dans notre étude, et, certains auteurs, considèrent qu'une telle sphérocytose est diagnostique d'une AHMI chez le chien.

■ La présence d'une **polychromatophilie** et d'**érythroblastes** sur le frottis sanguin est également notée. Leur présence est le plus souvent associée au caractère régénératif de l'anémie (17 cas). Toutefois, dans 1 cas (cas 1), ces signes sont associés à une anémie arégénérative mais à évolution inférieure à 5 jours ce qui laisse penser que ces signes sont apparus sur le frottis sanguin avant l'apparition d'une réticulocytose significative. L'anisocytose érythrocytaire, souvent observée, est un critère peu spécifique qui peut témoigner de la co-existence sur le frottis sanguin de polychromatophiles et de sphérocytes.

■ La recherche de parasites sanguins a révélé la présence :

- de piroplasmes dans 7 cas ;
- et dans un cas (cas 26), d'une morula d'*Ehrlichia* dans un plaquette et une dans un granulocyte.

■ Des **lymphocytes granuleux** sont signalés dans 8 cas. Dans 3 cas, leur présence des est associée à une piroplasmose, dans 2 cas, elle est associée à une ehrlichiose et dans 5 cas, aucune cause sous-jacente n'est identifiée mais cela pourrait éventuellement suggérer l'existence d'une affection rickettsienne non détectée par nos méthodes diagnostiques.

IV. Myélogramme

Un myélogramme est réalisé chez 12 chiens, essentiellement dans le but d'explorer les anémies arégénératives ou à caractère régénératif fluctuant.
Les données concernant les résultats du myélogramme sont collectés en *annexes 28 et 29.*

A. Lignée érythroïde

Anomalies morphologiques / Anomalies de nombre	Pas de signe de dysplasie	Signes de dysplasie
Hypoplasie	1	2
Nombre adéquat de précurseurs érythroïdes	2	3
Hyperplasie	1	3

Tableau 18 : Données du myélogramme concernant la lignée érythroïde

Parmi les 12 cas étudiés sont dénombrés :

- 3 cas d'hypoplasie. Dans un cas, cette hypoplasie est sévère mais n'est associée à aucun signe de dysplasie, alors que dans deux cas, l'hypoplasie est modérée mais des signes de dysplasie sont observés sur le lignée érythroïde.
- 3 cas pour lesquels la lignée érythroïde est normalement représentée mais présente des signes de dysérythropoïèse.
- 2 cas pour lesquels la lignée érythroïde est normalement représentée et ne présente pas d'anomalies morphologiques.
- 4 cas d'hyperplasie de la lignée érythroïde, associés à des signes de dysplasie dans 3 cas.
- Aucun cas d'aplasie n'est dénombré.

Pour la majorité de ces cas (8 cas) sont donc observés des signes de **dysérythropoïèse**, les signes de dysplasie étant les anomalies les plus fréquemment observées. Ces anomalies morphologiques sont le plus souvent associées à des hyperplasies ou à un nombre normal de précurseurs érythroïdes. Elles concernent les stades tardifs de différenciation, en particulier les érythroblastes polychromatophiles et acidophiles. Par ailleurs, 4 cas avec des images d'érythrophagocytose sont dénombrés (cas 20, 28, 31 et 37) et sont également classés en anémie centrale par dysérythropoïèse. Ces images sont dans 3 cas associées à des signes de dysplasies et elles traduisent une destruction intra médullaire, au moins partielle, de la lignée érythroïde. La phagocytose par les macrophages médullaires ou la lyse cellulaire suite à l'activation du complément pourraient survenir suite à l'activation d'anticorps sur les

éléments érythroïdes.

Ainsi, on observe bien une participation centrale pour certains cas d'anémies immunologiques. Cette participation centrale explique en partie l'absence de réticulocytose qui peut être observée dans certains cas lors de la consultation initiale alors que le phénomène évolue depuis plus de 5 jours ou le retard à l'apparition d'une réticulocytose satisfaisante.
Des cas d' « anémies arégénératives à médiation immune » sont ainsi décrits dans la littérature. La réaction immunologique pourrait donc également dirigée contre les précurseurs médullaires érythroïdes avec pour cible principale les stades tardifs. Cette réaction peut être dirigée contre un antigène commun aux précurseurs érythroïdes et aux globules rouges matures, d'où l'association possible de formes centrales et périphériques (*May 2003*) .

Dans six cas pour lesquels des signes de dysplasie sont observés, un TCD à froid a été réalisé. Il est positif dans cinq cas, dans deux cas, il a un titre supérieur ou égal au TCD à chaud et dans trois cas, il est positif alors que le TCD à chaud est négatif. Ceci semblerait indiquer que les anticorps responsables d' « anémies centrales à médiation immune » présentent préférentiellement un comportement thermique d'anticorps froids même si le faible nombre de cas ne permet pas d'apporter de conclusions significatives.

B. Populations cellulaires accessoires en proportion anormalement élevée

Sept cas sont associés à la présence en proportions anormalement élevées de populations cellulaires accessoires.

Des nids d'histiocytes sont retrouvés dans trois cas. La présence de tels granulomes histiocytaires évoque en priorité une leishmaniose (cas 39), beaucoup plus rarement une mycobactériose. Dans un cas, une infiltration médullaire histiocytaire est notée sans qu'une cause l'expliquant ne soit identifiée.

Une monocytose est relevée dans un cas, une plasmocytose dans 2 cas et une lymphocytose et une plasmocytose associées dans 2 cas, dont un cas correspondant à une leishmaniose. Ces populations cellulaires accessoires en proportion anormalement élevées peuvent résulter d'une stimulation immunitaire, en particulier d'origine infectieuse. Ainsi, l'ehrlichiose est souvent associée à une lymphocytose médullaire importante à lymphocytes granuleux et à une monocytose. Les plasmocytoses, quand à elles, peuvent être réactionnelles (lupus érythémateux systémique, leishmaniose, ehrlichiose...).

C. Anomalies de la lignée mégacaryocytaire

Les modifications détectées sur la lignée mégacaryocytaire sont de deux types :

■ des **hyperplasies sans anomalies morphologiques** : elles peuvent apparaître suite à des thrombopénies périphériques (hyperplasies compensatrices) ou suite à l'administration de glucocorticoïdes stimulant la mégacaryopoïèse.

■ des **anomalies morphologiques** (dysmégacaryopoièse). Les signes de dysplasie suggèrent une destruction intra médullaire d'au moins une partie de la lignée mégacaryocytaire. Du point de vue hématologique, elles se traduisent la plupart du temps par des thrombopénies de sévérité variable. Toutefois, des signes de dysplasie peuvent également être observés lors de thrombocytose. Ils sont alors accompagnés de façon systématique par des hyperplasies de la lignée mégacaryocytaire. Ces cas peuvent être interprétés comme des

cas de thrombopénie d'origine centrale répondant à un traitement mis en place avant la réalisation du myélogramme.

Cas	Anomalies de la numération plaquettaire	Anomalies de la lignée mégacaryocytaire
3	Aucune	Signes de dysplasie discrets
20	Thrombopénie sévère	Hyperplasie marquée
23	Aucune	Aucune
28	Aucune	Aucune
29	Thrombopénie légère	Hyperplasie marquée Signes de dysplasie sévères
31	Aucune	Hyperplasie Signes de dysplasie
32	Thrombopénie légère	Hyperplasie marquée Signes de dysplasie
33	Aucune	Aucune
34	Thrombocytose	Signes de dysplasie
36	Thrombopénie sévère	Hyperplasie marquée
37	Thrombopénie légère	Hyperplasie
39	Aucune	Aucune

Tableau 19 : Données du myélogramme concernant la lignée mégacaryocytaire

Dans 5 cas, des signes de dysplasie sont observés. Pour 3 de ces cas, des signes de dysplasie sont également observés sur la lignée érythroïde et pour 2 cas (34 et 33), ils sont observés uniquement sur la lignée mégacaryocytaire. Les signes de dysplasie signent une atteinte immunologique de la lignée mégacaryocytaire.
Ainsi, la réaction immunologique à médiation immune peut être dirigée à la fois contre les lignées érythroïde et mégacaryocytaire, l'association de ces deux affections, connue sous le nom de syndrome d'Evans, étant fréquemment rapportée dans la littérature.

D. Anomalies de la lignée myéloïde

Les seules anomalies de la lignée myéloïde constatées sont des anomalies de nombre. Les hyperplasies de la lignée myéloïde ne sont jamais associées à des dysmyélopoïèses et sont à corréler à la proportion importante de leucocytoses rencontrées dans notre étude. Les hyperplasies myéloïdes peuvent également faire suite à une atteinte inflammatoire. Par ailleurs, lors d'AHMI, on peut observer une stimulation non spécifique de la moelle osseuse avec en particulier une stimulation de la granulopoïèse.

V. Analyses en immuno-hématologie

A. Tests de Coombs

Les résultats des tests de Coombs sont répertoriés dans *l'annexe 23.*

1. TCD à chaud

Le TCD à chaud est réalisé chez 35 chiens puisque cela constitue un des critères d'inclusion dans l'étude, il n'est pas réalisé chez 5 chiens pour lesquels d'autres signes en

faveur d'un caractère immunologique de l'anémie sont présents : auto-agglutination et/ou sphérocytose observées lors de l'examen du frottis sanguin.

En considérant le seuil de positivité fixé à 1/8ième, le TCD à chaud est positif chez 24 animaux, soit 66% des animaux pour lequel il a été réalisé. Ce pourcentage élevé s'explique par le fait qu'on été inclus dans l'étude uniquement les animaux présentant un TCD positif ou des critères positifs lors de la lecture du frottis sanguin.

Le TCD à chaud est fortement positif (> 1/16) chez 13 chiens, soit 37% des cas.

Valeur du TCD à chaud	Nombre de cas
négatif	9
1/8	7
1/16	6
> 1/16	13

Tableau 20 : Résultats du TCD à chaud

Parmi les 9 cas pour lesquels le résultat du TCD à chaud est négatif :

- dans 6 cas, le TCD à froid est positif ;
- dans 3 cas, le TCD à froid est également négatif mais une auto-agglutination et/ou une sphérocytose majeure sont présentes sur le frottis sanguin.

2. TCD à froid

Le TCD à froid est réalisé chez 17 chiens (réalisation fonction de la date d'inclusion dans l'étude).

Valeur du TCD à froid	Nombre de cas
Négatif	4
1/8	4
1/16	5
> 1/16	4

Tableau 21 : Résultats du TCD à froid

Le seuil de positivité étant également fixé à 1/8ième, le TCD à froid est positif chez 13 chiens parmi les 17 chiens chez lesquels il a été réalisé, soit 76%.

On remarque :

- que le TCD à froid a un seuil de positivité supérieur à celui TCD à chaud chez 7 chiens, et même chez 6 de ces chiens, le TCD à froid est positif alors que le TCD à chaud est négatif. Ceci prouve bien l'intérêt de la réalisation systématique du TCD à froid pour la détection des anticorps froids ;
- que les TCD à froid et à chaud ont des seuils de positivité voisins chez 6 chiens ;
- que le TCD à froid est négatif chez un chien alors que le TCD à chaud est positif pour ce chien ;
- que les TCD à chaud et à froid sont tous deux négatifs chez 3 chiens.

La validité du TCD à froid est souvent remise en cause. En effet, plusieurs auteurs considèrent qu'il serait positif chez de nombreux chiens sains en raison de l'existence d'anticorps « froids » non pathogènes. Ainsi, dans 6 cas, le TCD à froid est positif alors que le TCD à chaud est négatif, on peut donc s'interroger sur la pertinence de ce résultat positif au

TCD à froid. Par ailleurs, l'établissement d'un seuil de positivité est difficile car peu d'études sont actuellement disponibles.

3. TCI

Le TCI est réalisé chez 27 chiens (réalisation en fonction de la quantité de sérum disponible).

Valeur du TCI	Nombre de cas
Négatif	5
¼	8
1/8	7
> 1/8	7

Tableau 22 : Résultats du TCI

Le seuil de positivité étant fixé à ¼, le TCI est positif chez 22 des 27 chiens testés, soit 81%.

Sa positivité signerait l'existence d'auto-anticorps et donc d'une anémie auto-immune au sens strict. Toutefois, plusieurs auteurs, notamment anglo-saxons, considèrent que le TCI présentent de nombreux inconvénients et il est donc peu utilisé dans les pays anglo-saxons, ce qui limite le nombre de données bibliographiques disponibles. Il donnerait ainsi lieu à l'existence de faux positifs en raison de la présence d'allo-anticorps allo-antigènes de groupes sanguins. Il conduirait également à l'apparition de faux négatifs en raison de sa faible sensibilité car les anticorps étant solidement liés aux globules rouges, leur taux dans le sérum serait souvent très bas.

Par ailleurs, étant donné que le TCI n'a pas été réalisé de façon systématique dans notre étude, cela limite les conclusions possibles.

4. Discussion des résultats

■ Les traitements antérieurs aux prélèvements sanguins peuvent influencer le résultat des tests de Coombs.

Les traitements antérieurs aux prélèvements sanguins sont recensés en *annexes 17 et 18.*

Ainsi, le cas 31 a reçu un traitement à base de prednisolone à 0,1 mg/kg/j depuis 10 jours avant la réalisation des tests de Coombs, ce qui peut expliquer leur négativité puisque chez ce chien, une auto-agglutination et une sphérocytose majeures sont observées à la lecture du frottis sanguin et ces critères sont plus longs à disparaître suite à un traitement corticoïdes.

Les autres chiens présentant un résultat négatif au test de Coombs n'ont pas reçu de traitement corticoïdes antérieur à la réalisation du test connu. Toutefois, étant donné l'importance des cas référés dans l'étude, nous ne pouvons exclure que des chiens aient pu recevoir un tel traitement, notamment une injection, par leur vétérinaire traitant et que nous n'en n'ayons connaissance.

■ Le test de Coombs pourrait manquer de sensibilité, en effet, chez les chiens pour lesquels le test de Coombs est négatif, une sphérocytose et/ou une auto-agglutination sont observées sur le frottis sanguin. Ceci pourrait donc indiquer chez ces chiens un manque de sensibilité du TCD ou une sensibilisation des GR par des isotypes d'immunoglobulines peu/mal détectés par le TCD.

■ Les seuils de positivité fixés dans notre étude doivent être interprétés avec précaution.

En effet, il n'existe actuellement pas de consensus clair concernant ces seuils. Dans notre étude, ils ont été établis sur la base d'une autre étude expérimentale effectuée de façon conjointe à notre étude et ayant pour but de les déterminer. Toutefois, des études supplémentaires seraient certainement nécessaires afin de valider des seuils de positivité reconnus par tous. Notons que de nombreux auteurs anglo-saxons se basent plus sur la mise en évidence de signes en faveur du caractère immunologique de l'anémie à l'examen du frottis sanguin que sur les résultats de ces tests immunologiques. Enfin, l'émergence de tests plus sensibles et spécifiques que les tests de Coombs depuis quelques années va peut être conduire à revoir les critères de définition des anémies immunologiques.

B. Dosage des anticorps anti-nucléaires

Le dosage des Acan est réalisé dans 6 cas, il est positif dans 2 cas (cas 23 et 34).

Ce dosage permet notamment d'identifier une éventuelle maladie lupique se développant en parallèle de l'anémie immunologique, puisque d'après les données de la littérature, cela constituerait une cause sous-jacente majeure. Dans le cas 23, d'autres signes pourraient éventuellement être en faveur du développement d'une telle maladie : atteinte glomérulaire, arthrite neutrophilique aseptique... mais d'autres critères seraient nécessaires pour définir plus précisément une maladie lupique.

Par ailleurs, lors d'anémie immunologique, le titre en **Acan** est **augmenté** chez environ 25% des chiens, ce qui appuie la pathogénie à médiation immune de l'anémie (*Stokol T. et al. 2000*). Le fort taux en Acan pourrait suggérer la présence d'anticorps dirigés contre les protéines nucléaires des précurseurs érythroïdes (*Holloway S.A. et al. 1990*). Toutefois, pour les deux cas présentant un dosage positif, une éventuelle origine centrale de l'anémie n'est pas mise en évidence à la lecture du myélogramme.

Le fait que ce dosage ait été guidé par des critères épidémiologiques et cliniques et n'ait pas été réalisé de manière systématique ne permet pas d'établir de conclusions significatives.

VI. Mise en évidence des agents bactériens

A. Résultats

La recherche des agents infectieux dans le cadre de l'étude a été effectuée selon trois techniques :

1. Par mise en évidence directe

L'examen microscopique du frottis sanguin est réalisé pour tous les cas sauf 1 (cas n°= 28, pas de frottis sanguin disponible)
Dans un cas (cas 26), une morula est mise en évidence dans une plaquette et une autre dans un polynucléaire neutrophile.

2. Par immunofluorescence indirecte

2.1.Recherche des anticorps anti-E. canis

La sérologie est positive dans 4 cas avec des titres variables : cas 9 (titre 1/800), cas 29

(titre 1/600), cas 26 (titre 1/160) et cas 33 (titre 1/80).

2.2.Recherche des anticorps anti- A. phagocytophilum

La sérologie est positive dans un cas : cas 33 (fluorescence fortement positive à 1/50ième).

3. Par technique PCR

Toutes les recherches par technique PCR se sont révélées négatives.

4. Bilan

Il existe donc **4 cas positifs** :
- 3 cas avec une sérologie positive à *E. canis*. Parmi ceux-ci, il existe par ailleurs une mise en évidence directe de morulas plaquettaire et leucocytaire dans un cas ;
- et un cas avec une sérologie à la fois positive pour *E. canis* et *A. phagocytophilum*.

B. Etude des cas présentant un résultat positif

Pour le **cas 9**, la présentation clinique correspond à celle que l'on peut rencontrer lors d'ehrlichiose monocytaire canine aiguë. Le tableau clinique est, en effet, dominé chez ce chien par un abattement important, une faiblesse généralisée, un amaigrissement et une dysorexie survenus brutalement depuis 15 jours et qui semblent s'aggraver. Ce chien présente également un œdème des membres et une douleur abdominale qui peuvent également être des signes de l'affection ehrlichienne. Les analyses hématologiques révèlent une anémie normocytaire normochrome arégénérative lors de la consultation initiale bien que les signes évoluent depuis une quinzaine de jours, ce qui semble indiquer une participation centrale. Toutefois, l'absence de réalisation d'un myélogramme dans ce cas ne permet pas de préciser la part de cette participation centrale. L'anémie est associée à une thrombopénie modérée. L'examen du frottis sanguin met en évidence de très nombreux lymphocytes granuleux, ce qui doit constituer un signe d'appel d'une éventuelle ehrlichiose. Le TCD à chaud et à froid est positif au 1/16ième alors que le TCI est négatif, il s'agirait donc d'une anémie à médiation immune. Des signes d'hémolyse sont présents : ictère et bilirubinurie, l'anémie semble donc hémolytique.
Ce chien présenterait donc une anémie hémolytique immunologique avec une composante centrale pouvant expliquer le retard à la régénération et une composante périphérique. Une thrombopénie concomitante est présente, dont l'origine ne peut être précisée.

Pour les **cas 26, 29 et 33**, la clinique est compatible avec des affections ehrlichiennes chroniques. En effet, pour ces 3 cas, le motif de consultation est représenté par des épisodes d'abattement évoluant depuis plusieurs mois par poussées successives. D'autres signes y sont associés tels qu'une hyperthermie, des douleurs ou une dysorexie selon le cas. Ces trois animaux présentent une anémie normocytaire normochrome arégénérative au moment de la consultation, elle est associée à une thrombopénie modérée dans un cas, et à une thrombopénie modérée et une leucopénie dans un autre cas. Plusieurs signes en faveur d'un phénomène hémolytique en cours sont observés dans le cas 33 (ictère, bilirubinurie et hyperbilirubinémie), seule une bilirubinurie est observée dans le cas 29 et aucun signe n'est noté pour le cas 26. Un myélogramme a été réalisé seulement pour le cas 29 et il est caractérisé par la présence de signes de dysplasie sévère sur la lignée érythroïde et la lignée

mégacaryocytaire expliquant les cytopénies sanguines constatées. Une participation centrale à l'anémie est donc présente dans ce cas et explique pour partie le caractère arégénératif de l'anémie. Quelques lymphocytes à cytoplasmes granuleux sont observés lors de l'examen du frottis du cas 33. En ce qui concerne le cas 26, deux morulas d'*Ehrlichia* au sens large sont observées lors de l'examen du frottis sanguin, une dans une plaquette et une dans un polynucléaire neutrophile. Or pour ce chien, la sérologie est positive au 1/160ième à *E. canis* mais on sait que la bactérie *E. canis* infecte classiquement les cellules sanguines mononuclées alors que *A. platys* est observée dans les plaquettes et *A. phagocytophilum* dans les granulocytes. Toutefois, il existe des réactions sérologiques croisées entre ces différents agents, ce qui peut expliquer la positivité de la sérologie. Des piroplasmes sont également observés sur le frottis sanguin de ce chien, ce qui témoigne d'une co-infection. Pour le cas 33, la sérologie est positive à la fois à *E. canis* et *A. phagocytophilum*, mais là encore l'existence de réactions sérologiques croisée ne permet pas de conclure à la coexistence de deux hémopathogènes. Pour le cas 33, le TCD à chaud et le TCI sont positifs, l'anémie semble donc à priori auto-immune, en ayant à l'esprit toutes les limites reconnues du TCI. Pour la cas 26, le TCD à chaud et à froid est positif, le TCI n'a pas été réalisé et pour le cas 29, aucun test de Coombs n'a été réalisé mais une sphérocytose majeure était présente sur le frottis sanguin et permettait donc de préjuger du caractère immunologique de l'anémie.

C. Limites des différentes méthodes utilisées

La **méthode cytologique** permettrait la mise en évidence des morulas *d'Ehrlichia canis* en théorie à partir du deuxième jour après l'infection (*Davoust 2001*), et des morulas *d'Anaplasma phagocytophilum* à partir du dix-huitième jour (*Kirtz 2005*). Les données manquent pour les autres types de rickettsies.

La cytologie est une méthode peu sensible, en raison de :
- la maigre proportion de cellules parasitées, surtout en dehors de la phase aiguë ;
- la fugacité des bactériémies ou leur caractère cyclique.

La méthode cytologique nécessite donc un œil avisé, la technique est souvent difficile et aléatoire. Ainsi, seuls 4% des frottis réalisés sur 221 chiens ehrlichiens présenteraient des morulas visibles pour un œil expérimenté (*Woody 1991*) ! La réalisation de concentrés leucocytaires permettrait d'augmenter la sensibilité (*Davoust 1993*).

Les **méthodes sérologiques** sont encore actuellement les méthodes de référence lors du diagnostic de rickettsioses au sens large. Ce sont des méthodes sensibles et spécifiques, permettant entre autre de dépister les porteurs asymptomatiques (*Martin 2004*).

Néanmoins, plusieurs limites existent. En ce qui concerne les ehrlichioses, la séroconversion a lieu lors du premier pic de parasitémie ou dans les jours qui suivent, 13 à 19 jours après l'inoculation. Le chien peut ensuite rester séropositif pendant de longues périodes, jusqu'à plusieurs années. Ainsi, après guérison, la sérologie peut demeurer positive plusieurs mois chez des animaux dont le titre initial en anticorps était faible ($\leq$ 1/160), et plus de 2 ans chez des animaux initialement positifs au 1/1280 ou plus (*Martin 2004*). Une des limites du test sérologique est donc la **fenêtre de séroconversion**, pendant laquelle la sérologie est encore négative alors que les premiers symptômes peuvent déjà être présents. La durée de cette période varie en fonction des différentes publications mais la majorité des auteurs s'accorde actuellement sur le fait que les premiers anticorps pourraient être détectables 7 jours après l'inoculation chez certains animaux, d'autres chiens pouvant devenir séropositifs jusqu'à 28 jours après cette inoculation (*Neer 2002*). Une seconde limite est le fait qu'une sérologie positive ne permette pas de distinguer infection aiguë et traces sérologiques d'une infection ancienne, à moins de réaliser une cinétique. Un chien en phase subclinique

d'ehrlichiose pourra donc présenter les signes d'une maladie intercurrente, sans rapport avec l'ehrlichiose et avoir un titre élevé en anticorps (*Davoust 2001, Harrus 1997, Mylonakis 2004b*), ceci étant particulièrement vrai en zone d'endémie où de nombreux chiens apparemment en bonne santé possèdent des anticorps contre un certain nombre de rickettsies (*Neer 2002*).

Des réactions sérologiques croisées existent entre les différentes bactéries de la famille des *Anaplasmataceae*. Ces réactions croisées sont toutefois variables et ne sont pas toujours reproductibles (*Neer 2002*) même si elles sont rapportées dans la littérature.

Enfin, il existe des variations concernant les « seuils de positivité ». Des faux positifs en immunofluorescence indirecte pour *E. canis* ont été rapportés pour des titres faibles (< 80) lors de certaines infections bactériennes. Ainsi, un titre supérieur ou égal à 80 est actuellement largement admis comme « seuil de positivité » (*Neer 2002*); les titres inférieurs ou les résultats négatifs devraient faire l'objet d'un suivi sérologique après 2 ou 3 semaines, ou être confirmés par d'autres méthodes diagnostiques (*Martin 2004*).

La **PCR**, quand à elle, est une technique très sensible (*McBride 1996*) et spécifique, qui constitue un des moyens de diagnostic le plus fiable. La technique peut, en effet, de façon expérimentale, donner un résultat positif alors que la sérologie est négative. Cette discordance peut s'expliquer :

- soit par une contamination récente, ainsi il est possible de mettre en évidence *E. canis* dans le sang de chiens infectés expérimentalement dès le 4ième jour après l'inoculation (*Davoust B. 2001*);

-soit par un traitement précoce qui décapite la réponse sérologique.

Inversement, des animaux infectés depuis longtemps peuvent être séropositifs et donner un résultat négatif en PCR. La PCR permettrait de détecter d'infimes fractions d'ADN *d'E. canis* à partir de 4 à 10 jours environ après l'infection expérimentale (*Iqbal 1994*), mais le délai de détection après l'infection dans les conditions naturelles reste inconnu. Par ailleurs, la majorité des données comparant les techniques de biologie moléculaire aux autres méthodes diagnostiques sont établie chez des chiens infectés expérimentalement, mais des études de terrain manquent encore pour valider la supériorité réelle de la PCR (*Neer 2002*).

En ce qui concerne les bartonelles, la culture n'est pas une méthode sensible chez le chien et les techniques sérologiques sont peu disponibles en France, la PCR serait donc actuellement la méthode de choix, bien que les différentes étapes manquent encore de standardisation (*Boulouis 2005, Breitschwerdt 2005a*).

D. Discussion des résultats négatifs

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer le faible nombre d'hémopathogènes identifiés dans notre étude.

1. Rôle des traitements antérieurs

Les traitements antérieurs aux prélèvements sanguins sont recensés en *annexes 17 et 18*.

Etant donné l'importance des cas référés au sein de l'étude, il existe un biais très important lié aux traitements antérieurs à la réalisation des prélèvements sanguins. En effet au moment de la réalisation des prélèvements, 16 animaux avaient déjà reçu un traitement

antibiotique, parmi ceux-ci 5 avaient reçu de la doxycycline, active sur les rickettsies. Deux animaux ont été traités un mois à la dose de 10 mg/kg/j avec cette molécule, ce qui correspond à la dose et la durée stérilisantes préconisées (*Neer 2002*) en matière de rickettsiose. Deux animaux ont été traités à la même dose pendant 10 jours seulement, ce qui semble insuffisant, à la vue du consensus existant actuellement sur le traitement de l'ehrlichiose monocytaire canine, pour stériliser l'organisme des animaux atteints. Toutefois, certaines publications rapportent qu'un traitement de 10 jours à la doxycyline à 10 mg/kg/j pourrait suffire à éliminer complètement certaines rickettsies autres que *Ehrlichia canis*, comme par exemple *Anaplasma platys (Beaufils 2004)*. La posologie et la durée du traitement ne sont pas connues pour le dernier chien. On peut imaginer que les traitements aient entraîné une diminution de la charge bactérienne de l'organisme telle que les bactéries ne puissent plus être détectées par nos méthodes diagnostiques, ce qui pourrait expliquer en partie les résultats négatifs de notre recherche.
Par ailleurs, 8 animaux ont également reçu de façon isolée ou en association avec un traitement antibiotique, une ou deux injections de dipropionate d'imidocarbe. Aucun consensus n'existe actuellement concernant l'efficacité de cette molécule sur les rickettsies mais là encore on ne peut pas exclure que cela ait pu avoir un effet défavorable sur la recherche des agents infectieux (*Neer 2002*).
Enfin, d'autres antibiotiques ont été administrés à certains animaux de l'étude avant la réalisation des prélèvements sanguins, et on ne peut, là encore, exclure leur effet potentiel sur une éventuelle infection rickettsienne. En effet, tous n'ont pas été testés contre les différentes espèces de rickettsies et leur efficacité n'est pas connue.

En ce qui concerne les bartonelloses, les macrolides, les fluroroquinolones utilisées seules ou en association avec l'amoxicilline, la doxycyline aurait un effet thérapeutique satisfaisant, la stérilisation de l'organisme étant obtenue là encore au terme d'un traitement de plusieurs semaines quelle que soit la molécule utilisée (*Breitschwerdt 2005a*). Dans notre étude, treize chiens ont reçu les molécules précitées de façon antérieure aux prélèvements sanguins, ce qui peut avoir influencer la recherche ultérieure des agents bactériens même si les traitements antibiotiques ont été de courte durée pour la grande majorité d'entre eux.

2. Diversité des espèces rickettsiennes

Les progrès effectués ces dernières années, grâce à la biologie moléculaire, dans la mise en évidence d'agents pathogènes et dans leur étude phylogénétique, a permis de mettre en évidence la diversité des rickettsies. On peut donc facilement imaginer que certains chiens puissent être infectés avec des espèces de rickettsies responsables, entre autre, d'anémies immunologiques et que nous ne sommes pas encore en mesure de détecter avec nos techniques diagnostiques actuelles. En effet, même s'il existe des réactions croisées nombreuses, celles-ci sont inconstantes et ne concernent sûrement pas toutes les rickettsies. On ne peut pas exclure la possibilité de l'émergence d'un agent infectieux encore inconnu responsable d'anémies immunologiques et expliquant la flambée de ces dernières depuis quelques années.

3. Problèmes techniques

L'hypothèse de la survenue d'un désagrément technique doit également être envisagée puisque en particulier toutes les recherches par PCR se sont révélées négatives.
On pourrait imaginer deux problèmes principaux :

- une extraction non productive le l'ADN, mais une mise en évidence de

l'ADN a bien été effectuée en présence de bromure d'éthidium dans les prélèvements avant amplification moléculaire, ce qui semble écarter cette hypothèse.

- La présence d'inhibiteurs, notamment de la Taq polymérase, dans les prélèvements, ce qui négativerait les résultats. Toutefois, là encore, lorsque de l'ADN positif a été ajouté dans certains extraits, la PCR s'est révélée positive.

Ainsi l'utilisation de témoins positifs semble écarter la survenue de problèmes techniques même si ceux-ci ne peuvent être totalement exclus.

4. Absence d'implication des agents recherchés

Malgré l'existence de publications ces dernières années suggérant le rôle des rickettsies lors d'anémie immunologique, aucune preuve tangible de leur implication n'existe à ce jour. Ainsi, on ne peut exclure que ces agents ne soient en réalité pas impliqués lors de telles anomalies hématologiques et que leur rôle potentiel ait été surestimé.

VII. Résultats des autres examens complémentaires

Les résultats des différents examens complémentaires sont recensés en *annexes 25 à 27.*

A. Recherche d'autres maladies infectieuses

Cas	Recherche effectuée	Résultat
3	Sérologie leishmaniose (IFI)	Négatif
4	PCR leptospirose	**Positif**
9	Sérologie leishmaniose (IFI)	Négatif
10	Sérologie leishmaniose (IFI) Sérologie leptospirose	Négatif **Positif** (séroconversion)
11	Sérologie leptospirose	Négatif
20	Sérologie borréliose	Négatif
23	Sérologie leishmaniose	Négatif
26	Sérologie leishmaniose Sérologie borréliose Sérologie herpesvirose	Négatif Négatif Négatif
28	PCR leishmaniose	Négatif
31	Sérologie leishmaniose	Négatif
35	Sérologie leishmaniose Sérologie néosporose	Négatif Négatif
36	Sérologie leptospirose	Négatif
39	Sérologie leishmaniose + mise en évidence directe lors examen myélogramme	**Positif**

Tableau 23 : Recherche de causes infectieuses

Une cause infectieuse sous-jacente, autre que celle recherchée de façon systématique dans le cadre de l'étude et se développant parallèlement à l'anémie a été identifiée dans 3 cas. Dans deux cas, il s'agit d'une leptospirose et dans un cas d'une leishmaniose. Par ailleurs, une piroplasmose est identifiée chez 7 chiens lors de l'examen du frottis sanguin, deux cas sont, en outre, confirmés par analyse PCR.

L'existence de ces causes infectieuses sous-jacentes lors d'anémie immunologique est rapportée dans la littérature. Si le rôle de la **piroplasmose** est bien étudié lors d'anémie immunologique, celui de la leptospirose et de la leishmaniose l'est moins. On sait, en effet, que la **leptospirose** peut provoquer une anémie hémolytique, en particulier lorsque les sérovars *Pomona* et *Icterohaemorrhagiae* sont impliqués. Cela est commun chez les veaux, les agneaux et les cochons mais beaucoup plus rarement décrit chez le chien (*Santoro 1994*). La **leishmaniose** peut également s'accompagner d'une anémie et un mécanisme immunologique est suspecté, la leishmaniose étant responsable de la formation d'immuns complexes circulants et de nombreuses complications dysimmunitaires (*Gopegui 2000*).

Par ailleurs, hormis la piroplasmose recherchée systématiquement lors de l'examen du frottis sanguin, les autres causes infectieuses n'ont pas été recherchées de façon systématique puisque cela ne correspondait pas au but de l'étude. Il est donc difficile d'établir une estimation claire de leur incidence lors d'anémie immunologique. Une piroplasmose est identifiée dans 17,5% des cas, ce qui confirme son rôle majeur dans la survenue d'anémie immunologique et justifie sa recherche systématique lors d'une telle atteinte hématologique.

B. Dosages biochimiques

Des dosages biochimiques concernant différents paramètres sont réalisés dans 27 cas afin de rechercher une éventuelle affection intercurrente et pour évaluer les effets de l'anémie sur l'organisme.
Les résultats des dosages biochimiques sont recensés dans les *annexes 25 à 27*.

Concentration sanguine	Nombre de chiens testés	Dans les valeurs usuelles	Diminuée	Augmentée	
Urée	23	15	-	2	6
Créatinine			-		N
PAl	25	15	-	4	N
AlAT			-		6
Protéines totales	11	9	1	1	
Albumine	4	3	1		
Cholestérol	3	3			
Triglycérides	1	1			
Acides biliaires/cholestérol	1			1	

Tableau 24 : Résultats des dosages biochimiques

En ce qui concerne les paramètres rénaux, dans 6 cas, seule la concentration en urée est augmentée, ce qui est compatible avec une insuffisance rénale pré-rénale. Les deux valeurs sont augmentées dans 2 cas, ce qui signe une insuffisance rénale. Ceci est similaire aux données rapportées dans la littérature. En effet, lors d'anémie immunologique, dans la majorité des cas, une insuffisance pré-rénale est observée et elle est liée à la déshydratation. Dans 2 cas, toutefois, l'insuffisance rénale est d'origine rénale. Ceci peut se rencontrer lors d'anémie immunologique,en particulier suite à l'état hypoxique engendré par l'anémie, mais il semble que dans les 2 cas de l'étude, cela soit plutôt lié aux affections concomitantes : une leptospirose et une leishmaniose.

En ce qui concerne les paramètres hépatiques, seule la concentration en PAl est

augmentée dans 6 cas. Les concentrations sont augmentées pour les deux paramètres dans 4 cas, ce qui traduit la coexistence d'une cholestase et d'une cytolyse hépatiques. L'augmentation isolée des phosphatases alcalines peut résulter d'une administration antérieure de glucocorticoïdes, cela correspond à trois cas (cas 14, 27 et 31), un autre chien reçoit également un traitement à base de phénobarbital ce qui peut majorer le paramètre. Une autre cause de cholestase lors d'anémie immunologique pourrait être liée à une hyperplasie du système des phagocytes mononuclés. Dans 4 cas, une atteinte hépatique plus sévère avec majoration des deux paramètres est présente. Dans 3 de ces cas, cela peut être associé à une cause sous-jacente évoluant en parallèle de l'anémie : leptospirose dans 2 cas et ehrlichiose dans 1 cas. Dans le dernier cas, aucune cause évidente d'atteinte hépatique n'est identifiée, mais cela pourrait résulter d'une hypoxie hépatocytaire.

La concentration sanguine en protéines totales est augmentée dans 1 cas et diminuée dans 1 cas. L'hyperprotéinémie (cas 37) peut être liée à un état de déshydratation ou se développer suite à l'évolution d'un processus inflammatoire, mais l'absence d'examens complémentaires ne permet pas d'apporter plus de précisions. L'origine de l'hypoprotéinémie, observée dans le cas 33, chez un chien atteint d'ehrlichiose chronique, ne peut pas non plus être précisée.

La concentration sanguine en albumine est diminuée dans 1 cas. D'après les données de la littérature, une hypoalbuminémie serait fréquemment rencontrée lors d'anémie immunologique. Elle pourrait notamment résulter d'une diminution de synthèse faisant suite à une régulation négative par certaines cytokines inflammatoires et/ou à une atteinte hépatique, une fuite protéique serait également en cause.

Les acides biliaires et l'ammonium sont augmentés dans un cas (cas 10) et feraient suite à l'atteinte hépatique sévère engendrée par la leptospirose en cours chez ce chien.

Un ionogramme est réalisé dans 6 cas : il est normale dans 3 cas, met en évidence une hypokaliémie dans 2 cas, une hypernatrémie dans un cas et une hyperphosphatémie dans un cas. Ces anomalies s'expliquent notamment par les troubles digestifs et la dysorexie accompagnant ces cas.

C. Résultats des autres examens complémentaires

D'autres examens complémentaires ont été réalisés de façon plus ponctuelle, essentiellement dans le but d'identifier une cause sous-jacente.
Ils ont permis l'identification de trois affections sous-jacentes autres que des causes infectieuses, à savoir un hémangiosarcome (cas 19), une histiocytose systémique (cas 20) et une pemphigoïde bulleuse (cas 21).

Une anémie immunologique est rapportée dans la littérature en association avec des processus tumoraux, en particulier avec un hémangiosarcome. En effet, lors d'**hémangiosarcome**, une anémie est fréquemment décrite. Il s'agit essentiellement d'une anémie hémolytique microangiopathique suite à l'existence de vaisseaux sanguins tortueux. L'anémie rencontrée peut également faire suite à des saignements à l'intérieur de la tumeur ou dans une cavité corporelle, ou elle peut résulter d'une CIVD fréquemment associée à ce type tumoral. Toutefois, une composante immunologique peut également concourir à l'anémie.

Une anémie immunologique n'a jamais été rapportée en association avec une histiocytose systémique. On constate ici une association entre les deux, sans pouvoir établir un lien de causalité strict. Par ailleurs, les données concernant l'histiocytose systémique sont peu nombreuses actuellement.

Dans un cas, l'anémie immunologique est associée au développement d'une dermatose

auto-immune, une pemphigoïde bulleuse. Cela est rapportée dans la littérature et s'inscrirait dans le cadre d'un désordre immunologique généralisé.

CONCLUSION

Les anémies immunologiques sont une cause fréquente d'anémie chez le chien. Ces anémies sont le plus souvent qualifiées de primaires ou « idiopathiques » dans la mesure où aucune cause sous-jacente ou maladie n'est identifiée. Elles peuvent, cependant, se développer parallèlement à d'autres processus pathologiques. Parmi ceux-ci, certaines maladies infectieuses, en particulier les rickettsioses, les ehrlichioses et les bartonelloses pourraient jouer un rôle lors de la survenue de telles anémies.

Notre étude porte sur 40 chiens recrutés à l'ENVL sur une période de deux ans et présentant une anémie immunologique définie sur la base d'un résultat positif au test de Coombs direct ou la présence d'une auto-agglutination et/ou d'une sphérocytose majeure à l'examen du frottis sanguin.

La recherche des principales maladies vectorielles bactériennes suscitées a été réalisée chez ces chiens par des méthodes directes (examen du frottis sanguin, biologie moléculaire) et indirectes (sérologie). La recherche s'est révélée positive dans quatre cas uniquement, trois pour *Ehrlichia canis* et un pour *Ehrlichia canis* et *Anaplasma phagocytophilum*. Ces quatre chiens présentaient en outre des signes cliniques pouvant être rattachés à une infection ehrlichienne évoluant sur une mode aigu pour un cas, ou chronique pour les trois autres. Aucune infection par *Bartonella sp.* n'a pu être mise en évidence.

Les hypothèses envisageables pour expliquer ce faible nombre de résultats positifs sont essentiellement de quatre ordres :

- une stérilisation potentielle de l'organisme ou une diminution nette de la bactériémie par des traitements antérieurs aux prélèvements sanguins ;
- un défaut de sensibilité des techniques utilisées;
- l'existence d'un agent bactérien impliqué dans la survenue d'anémies immunologiques non détecté par les méthodes diagnostiques utilisables actuellement ;
- et enfin, l'absence d'implication des agents recherchés dans la survenue d'anémies immunologiques.

Il serait toutefois intéressant de compléter cette recherche par une étude à plus grande échelle afin de confirmer ces résultats préliminaires et éventuellement de rechercher d'autres causes sous-jacentes associées aux anémies immunologiques, notamment d'autres maladies bactériennes.

Le Professeur responsable
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Luis CHABANNE
Docteur Vétérinaire

Vu : Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Pour le Directeur et par délégation,
LA DIRECTRICE DE L'ENSEIGNEMENT

Professeur Françoise GRAIN

Le Président de la thèse

L. JETENNE

Vu et permis d'imprimer 25 JUIN 2007

Pour Le Président de l'Université
Le Président du Comité de Coordination
Des Etudes Médicales

Professeur F.N GILLY

Bibliographie

1 - AROCH I., KLEMENT E. and SEGEV G. **(2005).**
Clinical, biochemical, and hematological characteristics, disease prevalence, and prognosis of dogs presenting with neutrophil cytoplasmic toxicity. J Vet Intern Med, 19, (1), 64-73.

2 - ASTRUP J.E. *et al.* **(1998).**
Canine autoimmune haemolytic anaemia and immune mediated thrombocytopenia: what are the risk factors? Proc.Brit.Small Anim. Vet. Assoc., pp.246.

3 - BADYLAK S.F. **(1981).**
A pathophysiologic approach to the diagnostic of hemolytic anemia in the dog. Compend. Contin. Educ. Pract. Vet., 3, (9), 827-831.

4 - BARKER R.N. **(1991).**
Electrophoretic analysis of erythrocyte membrane proteins and glycoproteins from different species. Comp. Haematol. Int., (1), 155-160.

5 - BARKER R.N. **(2000).**
Anemia associated with immune response. In: Feldman and al (eds): Schalm's veterinary hematology, Williams and Wilkins, 5th ed. Lippincott, pp 169-177.

6 - BARKER R.N. and ELSON C.J. **(1995).**
Red blood cell glycophorins as B and T-cell antigens in canine autoimmune haemolytic anaemia. Vet Immunol Immunopathol, 47, (3-4), 225-38.

7 - BARKER R.N., GRUFFYDD-JONES T.J. and ELSON C.J. **(1993a).**
Red cell-bound immunoglobulins and complement measured by an enzyme-linked antiglobulin test in dogs with autoimmune haemolysis or other anaemias. Res Vet Sci, 54, (2), 170-8.

8 - BARKER R.N. *et al.* **(1992).**
Autoimmune haemolysis in the dog: relationship between anaemia and the levels of red blood cell bound immunoglobulins and complement measured by an enzyme-linked antiglobulin test. Vet Immunol Immunopathol, 34, (1-2), 1-20.

9 - BARKER R.N. and JONES D.R. **(1993b).**
Effects of papain on the agglutination of canine red cells with serum autoantibodies. Res Vet Sci, 55, (2), 156-61.

10 - BEAUFILS J.P. **(2004).**
Anaplasma platys (Ex Ehrlichia platys) 1ière partie: étude bibliographique. Prat.Méd.Chir.Anim.Comp, (39), 23-30.

11 - BEAUFILS J.P. *et al.* **(2002).**
Anaplasma platys (Ehrlichia platys) infection in a dog in France: description of the case and characterization of the agent. Revue Méd.Vét., 153, (2), 85-90.

12 - BEAUFILS J.P. *et al.* **(2006).**
Aplasma platys (ex-Ehrlichia platys) 2ième partie: étude rétrospective de douze cas chez le chien. Prat.Méd.Chir.Anim.Comp, (41), 111-119.

13 - BENNETT D. *et al.* **(1981).**
Primary autoimmune haemolytic anaemia in the dog. Vet Rec, 109, (8), 150-3.

14 - BEXFIELD N.H., VILLIERS E.J. and HERRTAGE M.E. **(2005).**
Immune-mediated haemolytic anaemia and thrombocytopenia associated with Anaplasma phagocytophilum in a dog. J Small Anim Pract, 46, (11), 543-8.

15 - BOULOUIS H.J. *et al.* **(2005).**
Les infections à Bartonella chez les mammifères. Le nouveau praticien vétérinaire, (24), 298-302.

16 - BOURDOISEAU G. **(2005a).**
A propos de quelques "hémopathogènes": émergence et convergence. Le nouveau praticien vétérinaire, Août/Septembre, 13-16.

17 - BOURDOISEAU G. and GREZEL D. **(2005b).**
Cytoadhérence et séquestration. Le nouveau praticien vétérinaire, (24), 333-334.

18 - BOURDOISEAU G. and HUGNET C. **(2005c).**
Les babésioses canines: identités et interrogations. Le nouveau praticien vétérinaire, (24), 287-291.

19 - BREITSCHWERDT E.B. **(2005a).**
Canine bartonellosis. In: Ettinger S.J. and Feldman E.C. (eds): Textbook of Veterinary Internal Medicine, Elsevier Saunders, 6th
Philadelphia, pp 636-637.

20 - BREITSCHWERDT E.B. **(2005b).**
Obligate intracellular bacterial pathogens. In: Ettinger S.J. and Feldman E.C. (eds): Textbook of Veterinary Internal Medicine, Elsevier Saunders, 6th Philadelphia, pp 631-636.

21 - BREITSCHWERDT E.B. *et al.* **(2004).**
Clinicopathological Abnormalities and Treatment Response in 24 Dogs Seroreactive to Bartonella vinsonii (berkhoffii) Antigens. J Am Anim Hosp Assoc, 40, (2), 92-101.

22 - BURGESS K. *et al.* **(2000).**
Treatment of immune-mediated hemolytic anemia in dogs with cyclophosphamide. J Vet Intern Med, 14, (4), 456-62.

23 - CALVERT C.A., SAMMARCO C. and PICKUS C. **(2000).**
Positive Coombs'test results in txo dogs treated with amiodarone. J Am Vet Med Assoc, 216, (12), 1933-1936.

24 - CARR A.P., PANCIERA D.L. and KIDD L. **(2002).**
Prognostic factors for mortality and thromboembolism in canine immune-mediated hemolytic anemia: a retrospective study of 72 dogs. J Vet Intern Med, 16, (5), 504-9.

25 - CARTRON J.P. **(1999).**
RH blood group system and molecular basis of Rh-deficiency. Baillieres Best Pract Res Clin Haematol, 12, (4), 655-89.

26 - CHABANNE L. **(2006a).**
Les facteurs à l'origine des maladies auto-immunes. Le nouveau praticien vétérinaire, Février/Mars, 73-75.

27 - CHABANNE L. **(2006b).**
Tolérance au soi et auto-immunité. Le nouveau praticien vétérinaire, (26), 691.

28 - CHABANNE L. and MARTIN C. **(2005).**
Comment diagnostiquer et traiter l'ehrlichiose chez le chien. Le nouveau praticien vétérinaire, 24, 293-297.

29 - CHRISTIAN J.A. **(2000).**
Red blood cell survival and destruction. In: Feldman and al (eds): Schalm's veterinary hematology, Williams and Wilkins, 5thed. Lippincott, pp 117-124.

30 - CLARK D.A. *et al.* **(1984).**
Acquired immune hemolytic anemia associated with IgA erythrocyte coating: investigation of hemolytic mechanisms. Blood, 64, (5), 1000-5.

31 - COTTER S.M. **(1992).**
Autoimmune hemolytic anemia in dogs. Compend Contin Educ Pract Vet, 14, (1), 53-68.

32 - COWGILL E.S., NEEL J.A. and GRINDEM C.B. **(2003).**
Clinical application of reticulocyte counts in dogs and cats. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 33, (6), 1223-44, v.

33 - DAVOUST B. **(1993).**
L'ehrlichiose canine. Point Vét., 25, (151), 43-51.

34 - DAVOUST B. **(2001).**
Ehrlichiose monocytaire canine. Prat.Méd.Chir.Anim.Comp, (36), 553-564.

35 - DAY M.J. **(1996).**
Serial monitoring of clinical, haematological and immunological parameters in canine autoimmune haemolytic anaemia. J Small Anim Pract, 37, (11), 523-34.

36 - DAY M.J. **(1998a).**
Anemia in the dog and cat. Vet Q, 20 Suppl 1, S37-8.

37 - DAY M.J. **(1998b).**
Immune-mediated hemolytic anemia. Vet Q, 20 Suppl 1, S39-40.

38 - DAY M.J. **(1999).**
Antigen specificity in canine autoimmune haemolytic anaemia. Vet Immunol Immunopathol, 69, (2-4), 215-24.

39 - DAY M.J. **(2000).**
Immune-mediated hemolytic anemia. In: Feldman and al (eds): Schalm's veterinary hematology, Williams and Wilkins, 5th ed. Lippincott, pp 799-806.

40 - DODDS W.J. **(1977).**
Autoimmune hemolytic disease and other causes of immune-mediated anemia: an overview. J Am Anim Hosp Assoc, (13), 437-441.

41 - DODDS W.J. **(1983a).**
Immune-mediated blood diseases in dogs. Mod Vet Pract, 375-379.

42 - DODDS W.J. **(1983b).**
Immune-mediated diseases of the blood. Adv.Vet.Sci.Comp.Med., 27, 163-196.

43 - DUVAL D. and GIGER U. **(1996).**
Vaccine-associated immune-mediated hemolytic anemia in the dog. J Vet Intern Med, 10, (5), 290-5.

44 - ELLIOTT J. **(1997).**
Annual booster vaccinations. Is there an association with immune-mediated problems? J Small Anim Pract, 38, (4), 179-80.

45 - FERNANDEZ F.R. and GRINDEM C.B. **(2000).**
Reticulocyte response. In: Feldman and al (eds): Schalm's veterinary hematology, Williams and Wilkins, 5th ed. Lippincott, pp 110-116.

46 - FOURNEL C., PELLERIN J.L. and CHABANNE L. **(1994).**
Les anémies hémolytiques auto-immunes des carnivores domestiques. Point Vét., 26, (162), 343-352.

47 - FRANK J.R. and BREITSCHWERDT E.B. **(1999).**
A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. J Vet Intern Med, 13, (3), 194-201.

48 - GAILLOT H. and DELISLE F. **(1998).**
Les anémies chez le chien: étiologie, clinique et diagnostic. Point Vét., 29, (190), 237-246.

49 - GASSER A.M., BIRKENHEUER A.J. and BREITSCHWERDT E.B. **(2001).**
Canine Rocky Mountain Spotted fever: a retrospective study of 30 cases. J Am Anim Hosp Assoc, 37, (1), 41-8.

50 - GAUNT S.D. **(2000).**
Hemolytic anemias caused by blood rickettsial agents and protozoa. In: Feldman and al (eds): Schalm's veterinary hematology, Williams and Wilkins, 5thed. Lippincott, pp 154-162.

51 - GIGER U. **(2005).**
Regenerative anemias caused by blood loss or hemolysis. In: Ettinger S.J. and Feldman E.C. (eds): Textbook of Veterinary Internal Medicine, Elsevier Saunders, 6th Philadelphia, pp 1886-1907.

52 - GILMOUR M., LAPPIN M.R. and THRALL M.A. **(1991).**
Investigating primary acquired pure red cell aplasia in dogs. Vet Med, 1199-1204.

53 - GOLDMAN E.E. *et al.* **(1998).**
Granulocytic ehrlichiosis in dogs from North Carolina and Virginia. J Vet Intern Med, 12, (2), 61-70.

54 - GOODMAN R.A. and BREITSCHWERDT E.B. **(2005).**
Clinicopathologic findings in dogs seroreactive to Bartonella henselae antigens. Am J Vet Res, 66, (12), 2060-4.

55 - GOPEGUI R.R. **(2000).**
Congenital and acquired vascular wall disease. In: Feldman and al (eds): Schalm's veterinary hematology, Williams and Wilkins, 5th ed. Lippincott, pp 528-531.

56 - GOSSETT K.A. **(2000).**
Anemias associated with drugs and chemicals. In: Feldman and al (eds): Schalm's veterinary hematology, Williams and Wilkins, 5th ed. Lippincott, pp 185-189.

57 - GOULD D.J. *et al.* **(2000).**
Canine monocytic ehrlichiosis presenting as acute blindness 36 months after importation into the UK. J Small Anim Pract, 41, (6), 263-5.

58 - GRUNDY S.A. and BARTON C. **(2001).**
Influence of drug treatment on survival of dogs with immune-mediated hemolytic anemia: 88 cases (1989-1999). J Am Vet Med Assoc, 218, (4), 543-6.

59 - GUELFI J.F. **(1995).**
Renseignements fournis par l'examen de la morphologie des globules rouges sur un frottis sanguin chez le chien et chez le chat. Prat.Méd.Chir.Anim.Comp, 30, 639-646.

60 - HABIBI B. *et al.* **(1974).**
Autoimmune hemolytic anemia in children. Am J Med, 56, 61-70.

61 - HAGEDORN J.E. **(1988).**
Successful management of class I autoimmune hemolytic anemia in a dog. Compend Contin Educ Pract Vet, 10, (4), 418-427.

62 - HALLIWELL R.E. **(1978).**
Autoimmune disease in the dog. Adv Vet Sci Comp Med, 22, 221-63.

63 - HARRUS S. *et al.* **(1997).**
Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. Vet Rec, 141, (14), 360-3.

64 - HARVEY J.W. **(1980).**
Canine hemolytic anemias. J Am Vet Med Assoc, 176, (10 Pt 1), 970-4.

65 - HOLLOWAY S.A., MEYER D.J. and MANNELLA C. **(1990).**
Prednisolone and danazol for treatment of immune-mediated anemia, thrombocytopenia, and ineffective erythroid regeneration in a dog. J Am Vet Med Assoc, 197, (8), 1045-8.

66 - HONECKMAN A.L., KNAPP D.W. and REAGAN W.J. **(1996).**
Diagnosis of canine immune-mediated hematologic disease. Compend Contin Educ Pract Vet, 18, (2), 113-125.

67 - IQBAL Z., CHAICHANASIRIWITHAYA W. and RIKIHISA Y. **(1994).**
Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. J Clin Microbiol, 32, (7), 1658-62.

68 - JACKSON M.L. and KRUTH S.A. **(1985).**
Immune-mediated hemolytic anemia and thrombocytopenia in the dog: a retrospective study of 55 cases diagnosed from 1969 through 1983 at the Western College of Veterinary Medicine. Can Vet J, 26, 245-250.

69 - JACOBS R.M., MURTAUGH R.J. and CROCKER D.B. **(1984).**
Use of a microtiter Coombs'test for study of age, gender, and breed distributions in immunohemolytic anemia of the dog. J Am Vet Med Assoc, 185, (1), 66-69.

70 - JAIN N.C. **(1973).**
Osmotic fragility of erythrocytes of dogs and cats in health and in certain hematologic disorders. Cornell Vet, 63, (3), 411-23.

71 - JAIN N.C. **(1993).**
Hemolytic anemias associated with some infectious agents. In: (eds): Essentials of veterinary hematology, Lea and Febiger, Philadelphia, pp 177-192.

72 - JOHNSON L.R. **(2002).**
Activation of the immune system and thrombosis. J Vet Intern Med, 16, (5), 501-3.

73 - JONAS L.D., THRALL M.A. and WEISER G. **(1987).**
Nonregenerative form of immune-mediated hemolytic anemia in dogs. J Am Anim Hosp Assoc, (27), 201-204.

74 - JONES D.R. **(1986).**
Use of an enzyme indirect antiglobulin test for the diagnosis of autoimmune haemolytic anaemia in the dog. Res Vet Sci, 41, (2), 187-90.

75 - JONES D.R. and DARKE P.G. **(1975).**
Use of papain for the detection of incomplete erythrocyte autoantibodies in autoimmune haemolytic anaemia of the dog and cat. J Small Anim Pract, 16, (4), 273-9.

76 - JONES D.R. *et al.* **(1990).**
Investigation into factors influencing performance of the canine antiglobulin test. Res Vet Sci, 48, (1), 53-8.

77 - JONES D.R. *et al.* **(1992).**
Use of a direct enzyme-linked antiglobulin test for laboratory diagnosis of immune-mediated hemolytic anemia in dogs. Am J Vet Res, 53, (4), 457-65.

78 - JONES D.R. *et al.* **(1987).**
An enzyme-linked antiglobulin test for the detection of erythrocyte-bound antibodies in canine autoimmune haemolytic anaemia. Vet Immunol Immunopathol, 16, (1-2), 11-21.

79 - JONES D.R.E. and GRUFFYDD-JONES T.J. **(1991).**
The haematological consequences of immune-mediated anaemia in the dog. Comp. Haematol. Int., 1, 83-90.

80 - KAPLAN A.V. and QUIMBY F.W. **(1983).**
A radiolabeled staphylococcal protein A assay for detection of anti-erythrocyte IgG in warm agglutinin autoimmune hemolytic anemia of dogs and man. Vet Immunol Immunopathol, 4, (3), 307-17.

81 - KELTON J.G. *et al.* **(1985).**
The concentration of IgG in the serum is a major determinant of Fc-dependent reticuloendothelial function. Blood, 66, (3), 490-5.

82 - KIRTZ G. *et al.* **(2005).**
Anaplasma phagocytophilum infection in a dog: identifying the causative agent using PCR. J Small Anim Pract, 46, (6), 300-3.

83 - KLAG A.R. **(1992).**
Hemolytic anemia in dogs. Compend Contin Educ Pract Vet, 14, (8), 1090-1098.

84 - KLAG A.R., GIGER U. and SHOFER F.S. **(1993).**
Idiopathic immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 42 cases (1986-1990). J Am Vet Med Assoc, 202, (5), 783-8.

85 - KLEIN M.K., DOW S.W. and ROSYCHUK R.A. **(1989).**
Pulmonary thromboembolism associated with immune-mediated hemolytic anemia in dogs: ten cases (1982-1987). J Am Vet Med Assoc, 195, (2), 246-50.

86 - KUCINSKIENE G. *et al.* **(2005).**
Flow cytometric evaluation of bound IgG on erythrocytes of anaemic dogs. Vet J, 169, (2), 303-7.

87 - KUEHN N.F. and GAUNT S.D. **(1985).**
Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. J Am Vet Med Assoc, 186, (4), 355-358.

88 - LATIMER K.S. *et al.* **(1989).**
Zinc-induced hemolytic anemia caused by ingestion of pennies by a pup. J Am Vet Med Assoc, 195, (1), 77-80.

89 - LEWIS R.M. and PICUT C.A. **(1989).**
Hematologic disorders. In: (eds): Veterinary clinical immunology, WB.Saunders, Philadelphia, pp 9-43.

90 - LIESVELD J.L., ROWE J.M. and LICHTMAN M.A. **(1987).**
Variability of the erythropoietic response in autoimmune hemolytic anemia: analysis of 109 cases. Blood, 69, (3), 820-6.

91 - LILLIEHOULM K.L., EGENVALL A. and TVEDTEN H.W. **(1998).**
Hematopathology in dogs experimentally infected with a Swedish granulocytic Ehrlichia species. Vet Clin Pathol, 27, (4), 116-122.

92 - LUCROY M.D. and MADEWELL B.R. **(1999).**
Clinical outcome and associated diseases in dogs with leukocytosis and neutrophilia: 118 cases (1996-1998). J Am Vet Med Assoc, 214, (6), 805-7.

93 - MARTIN C. **(2004)**
*Les ehrlichioses du chien : étude bibliographique, diagnostic et comparaison de trois kits de diagnostic sérologique de l'ehrlichiose monocytaire.*Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon, 179

94 - MASON N. *et al.* **(2003).**
Cyclophosphamide exerts no beneficial effect over prednisone alone in the initial treatment of acute immune-mediated hemolytic anemia in dogs: a randomized controlled clinical trial. J Vet Intern Med, 17, (2), 206-12.

95 - MATTHEWMAN L.A. *et al.* **(1993).**
Infections with Babesia canis and Ehrlichia canis in dogs in Zimbabwe. Vet Rec, 133, (14), 344-6.

96 - MAY F. **(2003)**
*Les anémies centrales à médiation immune dans l'espèce canine: étude épidémiologique, clinique et hématologique de 36 cas. Comparaison avec les données humaines.*Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon, 190

97 - MAZZA G. *et al.* **(1994).**
Preparation of monoclonal antibodies specific for the subclasses of canine IgG. Res Vet Sci, 57, (2), 140-5.

98 - McBRIDE J.W. *et al.* **(1996).**
PCR detection of acute Ehrlichia canis infection in dogs. J Vet Diagn Invest, 8, (4), 441-7.

99 - McCULLOUGH S. **(2003).**
Immune-mediated hemolytic anemia: understanding the nemesis. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 33, (6), 1295-315.

100 - McMANUS P.M. and CRAIG L.E. **(2001).**
Correlation between leukocytosis and necropsy findings in dogs with immune-mediated hemolytic anemia: 34 cases (1994-1999). J Am Vet Med Assoc, 218, (8), 1308-13.

101 - MEITE M. *et al.* **(2000).**
Exacerbation of autoantibody-mediated hemolytic anemia by viral infection. J Virol, 74, (13), 6045-9.

102 - MELLANBY R.J. *et al.* **(2004).**
Immune-mediated haemolytic anaemia associated with a sarcoma in a flat-coated retriever. J Small Anim Pract, 45, (1), 21-4.

103 - MELLOR P.J. *et al.* **(2005).**
Neutrophilic dermatitis and immune-mediated haematological disorders in a dog: suspected adverse reaction to carprofen. J Small Anim Pract, 46, (5), 237-42.

104 - MILLER E. **(2003).**
CVT update: diagnosis and treatment of immune-mediated hemolytic anemia. In: (eds): Current veterinary therapy VII, WB Saunders, Philadelphia, pp 427-434.

105 - MILLER S.A., HOHENHAUS A.E. and HALE A.S. **(2004).**
Case-control study of blood type, breed, sex, and bacteremia in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. J Am Vet Med Assoc, 224, (2), 232-5.

106 - MYLONAKIS M.E. *et al.* **(2004a).**
Mixed Ehrlichia canis, Hepatozoon canis, and presumptive Anaplasma phagocytophilum infection in a dog. Vet Clin Pathol, 33, (4), 249-51.

107 - MYLONAKIS M.E. *et al.* **(2004b).**
Chronic Canine Ehrlichiosis (Ehrlichia canis): A Retrospective Study of 19 Natural Cases. J Am Anim Hosp Assoc, 40, (3), 174-84.

108 - NATHALANG O. *et al.* **(1997).**
Comparison between the conventional tube technique and the gel technique in direct antiglobulin tests. Vox Sang, 72, (3), 169-71.

109 - NEER T.M. *et al.* **(2002).**
Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. American College of Veterinary Internal Medicine. J Vet Intern Med, 16, (3), 309-15.

110 - NOBLE S.J. and ARMSTRONG P.J. **(1999).**
Bee sting envenomation resulting in secondary immune-mediated hemolytic anemia in two dogs. J Am Vet Med Assoc, 214, (7), 1026-7, 1021.

111 - PARK D., YANG C. and KIM K. **(1987).**
Autoimmune hemolytic anemia in children. Yonsei Med J, 28, 313-321.

112 - PERSON J.M. *et al.* **(1988).**
Les anémies hémolytiques auto-immunes du chien: étude retrospective de 35 cas diagnostiqués à l'école nationale vétérinaire d'Alfort entre 1980 et 1988. Prat.Méd.Chir.Anim.Comp, (4), 297-308.

113 - PESILLO S.A., FREEMAN L.M. and RUSH J.E. **(2004).**
Assessment of lipid peroxidation and serum vitamin E concentration in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. Am J Vet Res, 65, (12), 1621-4.

114 - POITOUT F., AIRD B. and PERMAN V. **(1994-1995).**
Hématologie des anémies hémolytiques à médiation immunitaire.Conséquences diagnostiques. Point Vét., 26, (164), 775-781.

115 - PORTER R.E. and WEISER M.G. **(1990).**
Effect of immune-mediated erythrocyte agglutination on analysis of canine blood using a multichannel blood cell counting system. Vet Clin Pathol, 19, (2), 45-50.

116 - QUIMBY F.W. *et al.* **(1980).**
Efficacy of immunoserodiagnostic procedures in the recognition of canine immunologic diseases. Am J Vet Res, 41, (10), 1662-6.

117 - REIMER M.E., TROY G.C. and WARNICK L.D. **(1999).**
Immune-mediated hemolytic anemia: 70 cases (1988-1996). J Am Anim Hosp Assoc, 35, (5), 384-91.

118 - ROCHANT H. **(2001).**
Anémies hémolytiques auto-immunes. Revue du praticien, 51, 1534-1541.

119 - SANTORO M.L. *et al.* **(1994).**
Decreased erythrocyte osmotic fragility during canine leptospirosis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 36, (1), 1-5.

120 - SAVARY-BATAILLE K. **(2002).**
Conduite diagnostique face à une anémie. Point Vét., (229), 50-53.

121 - SCHREIBER A.D., ATKINSON J.P. and JAFFE C.J. **(1977).**
NIH conference. Pathophysiology of immune hemolytic anemia. Ann Intern Med, 87, (2), 210-22.

122 - SCOTT-MONCRIEFF J.C. *et al.* **(1995).**
Treatment of nonregenerative anemia with human gamma-globulin in dogs. J Am Vet Med Assoc, 206, (12), 1895-900.

123 - SCOTT-MONCRIEF J.C. *et al.* **(2001).**
Hemostatic abnormalities in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. J Am Anim Hosp Assoc, 37, (3), 220-7.

124 - SCOTT M.A. **(2000).**
The hematologic effects of immunologic diseases. In: Feldman and al (eds): Schalm's Veterinary Hematology, Williams and Wilkins, 5th ed. Lippincott, pp 51-56.

125 - SHAW S.E. *et al.* **(2005).**
Molecular evidence of tick-transmitted infections in dogs and cats in the United Kingdom. Vet Rec, 157, (21), 645-8.

126 - SKOTARCZAK B. **(2003).**
Canine ehrlichiosis. Ann Agric Environ Med, 10, (2), 137-41.

127 - SLAPPENDEL R.J. **(1979).**
The diagnostic significance of the direct antiglobulin test (DAT) in anemic dogs. Vet Immunol Immunopathol, 1, (1), 49-59.

128 - SOKOL R.J., HEWITT S. and STAMPS B.K. **(1981).**
Autoimmune haemolysis: an 18-year study of 865 cases referred to a regional transfusion centre. Br Med J (Clin Res Ed), 282, (6281), 2023-7.

129 - STEWART A.F. and FELDMAN B.F. **(1993a).**
Immune-mediated hemolytic anemia.Part I.An overview. Compend Contin Educ Pract Vet, 15, (3), 372-381.

130 - STEWART A.F. and FELDMAN B.F. **(1993b).**
Immune-mediated hemolytic anemia.Part II.Clinical entity, diagnosis, and treatment theory. Compend Contin Educ Pract Vet, 15, (11), 1479-1491.

131 - STOKOL T., BLUE J.T. and FRENCH T.W. **(2000).**
Idiopathic pure red cell aplasia and nonregenerative immune-mediated anemia in dogs: 43 cases (1988-1999). J Am Vet Med Assoc, 216, (9), 1429-36.

132 - STONE M.S. *et al.* **(1994).**
Lupus-type "anticoagulant" in a dog with hemolysis and thrombosis. J Vet Intern Med, 8, (1), 57-61.

133 - SUTO Y. *et al.* **(2001).**
First confirmed canine case of Ehrlichia canis infection in Japan. Vet Rec, 148, (26), 809-11.

134 - SWITZER J.W. and JAIN N.C. **(1981).**
Autoimmune hemolytic anemia in dogs and cats. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 11, (2), 405-20.

135 - TAYLOR F.G. and COOKE B.J. **(1990).**
Use of erythrocyte fragility profiles for monitoring immune-mediated haemolysis in horses. Res Vet Sci, 48, (1), 138-40.

136 - THEBAULT A. **(2005).**
Les anémies hémolytiques à médiation immune. Point Vét., 36, (261), 46-51.

137 - THRALL M.A. *et al.* **(2004).**
Regenerative anemia. In: (eds): Veterinary hematology and clinical chemistry, Williams and Wilkins, Lippincott, pp 98-107.

138 - TISSOT J.D. *et al.* **(1999).**
The direct antiglobulin test: still a place for the tube technique? Vox Sang, 77, (4), 223-6.

139 - TORRANCE A.G. and FULTON R.B. **(1987).**
Zinc-induced hemolytic anemia in a dog. J Am Vet Med Assoc, 191, (4), 443-4.

140 - TSUCHIDA S. *et al.* **(1991).**
Autoantibodies and red blood cell membrane proteins in a case of canine autoimmune hemolytic anemia. J Vet Med Sci, 53, (1), 19-21.

141 - WARDROP K.J. **(2005).**
The Coobs'test in veterinary medicine: past, present, future. Vet Clin Pathol, 34, (4), 325-334.

142 - WEINKLE T.K. *et al.* **(2005).**
Evaluation of prognostic factors, survival rates, and treatment protocols for immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 151 cases (1993-2002). J Am Vet Med Assoc, 226, (11), 1869-80.

143 - WEISS D.J. **(2000).**
Pure red cell aplasia. In: Feldman and al (eds): Schalm's veterinary hematology, Williams and Wilkins, 5th ed. Lippincott, pp 210-211.

144 - WEISS D.J. **(2002).**
Primary pure red cell aplasia in dogs: 13 cases (1996-2000). J Am Vet Med Assoc, 221, (1), 93-5.

145 - WEISS D.J. and ARMSTRONG P.J. **(1984).**
Nonregenerative anemias in the dog. Compend Contin Educ Pract Vet, 452-453.

146 - WEISS D.J. and BRAZZELL J.L. **(2006).**
Detection of activated platelets in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. J Vet Intern Med, 20, (3), 682-6.

147 - WESTHOFF C.M. **(2007).**
The structure and function of the Rh antigen complex. Semin Hematol, 44, (1), 42-50.

148 - WILKERSON M.J. *et al.* **(2000).**
Isotype-specific antibodies in horses and dogs with immune-mediated hemolytic anemia. J Vet Intern Med, 14, (2), 190-6.

149 - WOODY B.J. and HOSKINS J.D. **(1991).**
Ehrlichial diseases of dogs. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 21, (1), 75-98.

150 - WORLLEDGE S.M. **(1978).**
The interpretation of a positive direct antiglobulin test. Br J Haematol, 39, (2), 157-62.

Index des figures

Figure 1: *Les différents mécanismes de fixation des immunoglobulines et du complément sur les hématie* 15
Figure 2 : *Le rôle des systèmes de régulation et la balance des cytokines* 19
Figure 3 : *Structure membranaire érythrocytaire simplifiée chez l'homme* 22
Figure 4 : *Mise en place du complexe d'attaque membranaire* 31
Figure 5 : *Représentation schématique de l'agglutination* 32
Figure 6 : *Mécanisme de destruction extravasculaire des GR* 34
Figure 7 : *Représentation schématique des différents types d'hémolyse* 35
Figure 8 : *Représentation schématique des affections thromboemboliques lors d'AHMI* 63
Figure 9 : *Anisocytose érythrocytaire, polychromatophilie et sphérocytose* 65
Figure 10 : *Formation des sphérocytes* 65
Figure 11 : *Réticulocytes mis en évidence sur un frottis sanguin coloré au bleu de Crésyl brillant* 67
Figure 12 : *Représentation schématique de la dégradation de l'hémoglobine* 76
Figure 13 : *Agglutination macroscopique* 83
Figure 14 : *Agglutination microscopique* 83
Figure 15 : *Représentation schématique d'un test de Coombs positif* 85
Figure 16 : *Représentation schématique d'un TCI positif* 93
Figure 17 : *Représentation schématique de l'amplification de l'agglutination via un prétraitement enzymatique* 96
Figure 18 : *Représentation schématique des résultats obtenus lors du gel test et gradation de ces résultats* 97
Figure 19 : *Représentation schématique du test DELAT* 99

Index des encadrés

Encadré 1 : *Rappel sur le complément* 31
Encadré 2 : *Rappels sur la morphologie normale et anormale des GR* 64

Index des tableaux

Tableau 1 : *Principales causes d'anémie hémolytique chez le chien* 11
Tableau 2 : *Classification pathogénique des anémies immunologiques* 13
Tableau 3 : *Affections susceptibles de s'accompagner d'une anémie immunologique* 17
Tableau 4 : *Classification immunologique des anémies immunologiques* 30
Tableau 5 : *Les principales ehrlichioses canines* 41
Tableau 6 : *Agents responsables des babésioses du chien* 43
Tableau 7 : *Synthèse bibliographique des prédispositions épidémiologiques lors d'AHMI* ... 55
Tableau 8 : *Synthèse bibliographique des principaux symptômes rencontrés lors d'AHMI* ... 59
Tableau 9 : *Données épidémiologiques pour les 40 cas de l'étude* 115
Tableau 10 : *Répartition en fonction de la taille pour les 35 chiens de l'étude de race "définie"* 116
Tableau 11 : *Répartition en fonction de l'âge des 40 chiens de l'étude* 116
Tableau 12 : *Motifs de consultation pour 39 chiens* 117
Tableau 13 : *Signes cliniques observés chez 40 chiens* 118
Tableau 14 : *Récapitulatif des signes en faveur d'un processus hémolytique chez les 40 chiens de l'étude* 121

Tableau 15 : *Classification en fonction du taux d'hémoglobine pour les 40 chiens de l'étude* 121
Tableau 16 : *Paramètres de la lignée plaquettaire chez les 40 chiens de l'étude* 123
Tableau 17 : *Paramètres de la lignée leucocytaire pour les 40 chiens de l'étude* 123
Tableau 18 : *Données du myélogramme concernant la lignée érythroïde* 125
Tableau 19 : *Données du myélogramme concernant la lignée mégacaryocytaire* 127
Tableau 20 : *Résultats du TCD à chaud* 128
Tableau 21 : *Résultats du TCD à froid* 128
Tableau 22 : *Résultats du TCI* 129
Tableau 23 : *Recherche de causes infectieuses* 135
Tableau 24 : *Résultats des dosages biochimiques* 136

Index des annexes

Annexe 1 : *Valeurs usuelles d'un hémogramme chez le chien (laboratoire d'Immunologie et Hématologie, ENVL)* 154
Annexe 2 : *Questionnaire envoyé aux vétérinaires praticiens* 155
Annexe 3 : *Procédures pour la purification d'ADN* 156
Annexe 4 : *Caractéristiques de la sonde moléculaire et du programme PCR pour la recherche des Rickettsia* 157
Annexe 5 : *Caractéristiques de la sonde moléculaire et du programme PCR utilisé pour la recherche d'Ehrlichia sp.* 158
Annexe 6 : *Caractéristiques de la sonde moléculaire et du programme PCR utilisés pour la recherche d'Anaplasma phagocytophilum.* 159
Annexe 7: *Caractéristiques de la sonde moléculaire et du programme PCR utilisés pour la recherche de Bartonella sp.* 160
Annexe 8 : *Principales races de la population de référence* 161
Annexe 9 : *Répartition des chiens de la population de référence en fonction de l'âge* 162
Annexe 10 : *Répartition en fonction du sexe des animaux de la population de référence* 162
Annexe 11 : *Caractéristiques épidémiologiques des 40 chiens de l'étude* 163
Annexe 12 : *Motif de consultation et examen clinique des cas 1 à 10* 164
Annexe 13 : *Motif de consultation et examen clinique des cas 11 à 17* 165
Annexe 14 : *Motif de consultation et examen clinique des cas 18 à 25* 166
Annexe 15 : *Motif de consultation et examen clinique des cas 26 à 34* 167
Annexe 16 : *Motif de consultation et examen clinique des cas 35 à 40* 168
Annexe 17 : *Traitements antérieurs aux prélèvements sanguins* 169
Annexe 18 : *Traitements antérieurs aux prélèvements sanguins* 170
Annexe 19 : *Paramètres hématologiques cas 1 à 15* 171
Annexe 20 : *Paramètres hématologiques cas 16 à 31* 172
Annexe 21 : *Paramètres hématologiques cas 32 à 40* 173
Annexe 22 : *Commentaires frottis sanguin* 174
Annexe 23 : *Résultats tests de Coombs* 175
Annexe 24 : *Résultats analyse urinaire* 176
Annexe 25 : *Résultats examens complémentaires cas 1 à 19* 177
Annexe 26 : *Résultats examens complémentaires cas 20 à 28* 178
Annexe 27 : *Résultats examens complémentaires cas 29 à 40* 179
Annexe 28 : *Données myélogramme* 180
Annexe 29 : *Données myélogramme* 181
Annexe 30 : *Causes sous-jacentes identifiées et méthodes diagnostiques* 182

ANNEXES

Annexe 1 : Valeurs usuelles d'un hémogramme chez le chien (laboratoire d'Immunologie et Hématologie, ENVL)

Leucocytes ($10^3/mm^3$)	6 – 17
Polynucléaires neutrophiles	3 – 11,8
Polynucléaires éosinophiles	0,1 – 1,25
Polynucléaires basophiles	Rares
Lymphocytes	1 – 4,8
Monocytes	0,15 – 0,35
Plaquettes ($10^3/mm^3$)	200 – 500
Hématies ($10^6/mm^3$)	5,5 – 8,5
Hémoglobine (g/dL)	12,0 – 18,0
Hématocrite (%)	37 – 55
VGM (fl)	60 – 77
CCMH (g/dL)	31 – 36
TCMH (pg)	17 – 23

Annexe 2 : Questionnaire envoyé aux vétérinaires praticiens

Echantillonnage

L'échantillonnage concerne tous les **CHIENS** atteints **d'anémie hémolytique**,qu'une cause soit identifiée ou non, notamment sont inclus les cas de babésiose, définie comme suit :
-taux d'hémoglobine inférieur à 12g/dL
-signes d'hémolyse : ictère, bilirubinurie, hémoglobinurie, hyperbilirubinémie, splénomégalie. Sont exclues les anémies secondaires à un traumatisme (hémorragies) ou à une intoxication aux anti-coagulants, ainsi que les anémies arégénératives.
La récolte du sang doit se faire si possible avant tout traitement, dans le cas échéant, merci de préciser dans les commémoratifs les traitements reçus (nom de la molécule, durée, posologie).

Liste des éléments envoyer

(merci d'inscrire en haut de la feuille des commémoratifs : **protocole expérimental/anémies immunologiques**)

-**commémoratifs** : race, sexe, âge, symptômes et durée d'évolution, en particulier présence de signes d'hémolyse (ictère, bilirubinurie, hémoglobinurie, hyperbilirubinémie, splénomégalie)
-une copie des **résultats de la NFS** (obtenus avec votre analyseur ou via un laboratoire d'analyse)
-résultats des autres examens (biochimie, radiographie thoracique, échographie abdominale, ponctions articulaires...)
-**2 frottis sanguins** séchés et non colorés (pour le calcul de la réticulocytose, la recherche d'hémoparasites...)
-sang sur **tube EDTA 5mL** (grand minimum 2 mL)
-sang sur **tube sec 5mL** (grand minimum 2mL)

Dans la mesure du possible, les prélèvements doivent être acheminés le plus rapidement possible au laboratoire d'hématologie de l'ENVL :

ENVL
LABORATOIRE D'HEMATOLOGIE
(Protocole expérimental/anémies immunologiques)
1, avenue Bourgelat
69 280 MARCY L'ETOILE

Annexe 3 : Procédures pour la purification d'ADN

	NucleoSpin® Blood QuickPure
1 Lyse blood samples	200 µl blood 25 µl prot. K 200 µl BQ1 Mix 70°C 10-15 min
2 Adjust DNA binding conditions	200 µl ethanol
3 Bind DNA	load all 1 min 11,000 x g
	—
4 Wash silica membrane	350 µl BQ2
1st wash	3 min 11,000 x g
2nd wash	—
5 Dry silica membrane	Drying is performed during centrifugation of the single washing step
6 Elute highly pure DNA	50 µl BE (70°C) RT 1 min 1 min 11,000 x g

Annexe 4 : Caractéristiques de la sonde moléculaire et du programme PCR pour la recherche des *Rickettsia*

PCR Rickettsia (PCR simple) gène :

Amorces (Eurobio, Les Ulis, France)

Rsfg 877 = GGG GGC CTG CTC ACG GCG G
Rsfg 1258 = ATT GCA AAA AGT ACA GTG AAC A

Taq Polymérase : Takkara (Japon)

- Programme PCR

1. 95°C 10 mns
2. 94°C 1 mn
3. **60°C** 1 mn
4. 72°C 1 mn
5. Go to 2 Rep 5x
6. 94°C 1mn
7. **53°C** 1mn
8. 72°C 1mn
9. Go to 6 Rep 30x
10. Hold 11°C ===} ∞

*Taille attendue du produit = **380 pb (paires de bases)***

Annexe 5 : Caractéristiques de la sonde moléculaire et du programme PCR utilisé pour la recherche *d'Ehrlichia sp.*

Ehrlichia sp. (Large spectre : Ehrlichia et anaplasma spp) gène : ARNr 16S

- Amorces

EHR16S D : GGT ACC YAC AGA AGA AGT CC
EHR16S R: TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC

- Programme PCR

1. 95°C 8 mns
2. 94°C 40sec
3. **50°**C 40sec
4. 72°C 1 mn
5. Go to 2 Rep 34x
6. 72° 10 mns
7. Hold 11°C ==} ∞

*Taille attendue du produit = **346 pb***

Annexe 6 : Caractéristiques de la sonde moléculaire et du programme PCR utilisés pour la recherche *d'Anaplasma phagocytophilum.*

Anaplasma phagocytophilum (PCR emboitée) Gène : ARNr 16S

-Amorces prémière PCR

Ge3 a = CAC ATg CAA gTC gAA Cgg ATT ATT C
Ge10 R= TTC CgT TAA gAA ggA TCT AAT CTC C

- PCR1 Programme

1. 95°C 8 mns
2. 94°C 1mn
3. **50°**C 1mn
4. 72°C 1 mn
5. Go to 2 Rep 39x
6. 72° 10 mns
7. Hold 11°C ===} ∞

*Taille du produit = **932 pb***

- Amorces deuxième PCR2

Ge9 F = AAC ggA TTA TTC TTT ATA gCT TgC T
Ge2 R = ggC AgT ATT AAA AgC AgC TCC Agg

- PCR2 Programme

1. 95°C 8 mns
2. 94°C 1mn
3. **50°**C 1mn
4. 72°C 1 mn
5. Go to 2 Rep 29x
6. 72° 10 mns
7. Hold 11°C ===} ∞

*Taille attendue du produit = **546 pb***

Annexe 7: Caractéristiques de la sonde moléculaire et du programme PCR utilisés pour la recherhe de *Bartonella sp.*

Bartonella (PCR semi emboitée) ARN 16S

ARN 16 S

Amorces

P8 = AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG

PC535 = GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCAC

♦ Programme PCR 1

1. 94°C 8 mns
2. 94°C 2mns
3. **54°C** 30sec
4. 72°C 30sec
5. Go to 2 Rep 44x
6. 72° 10 mns
7. Hold 11°C ===} ∞ *Taille du produit = **500 pb***

♦ Programme PCR2

- prélever 5 µl amplifiat de la PCR 1 dilué au 1/100eme pour

Amorces PCR PC535 = GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA

BSP 16S F =TCT CTA CGG AAT AAC ACA GA (amorce dessinée dans l'UMR BIPAR)

1. 94°C 8 mns
2. 94°C 1mn
3. **54°C** 1mn
4. 72°C 1mn
5. Go to 2 Rep 34x
6. 72° 10 mns
7. Hold 11°C ===} ∞

*Taille attendue du produit = **380 pb***

Annexe 8 : Principales races de la population de référence

Race	Nombre de chiens	Pourcentage (%)	Race	Nombre de chiens	Pourcentage (%)
Labrador	696	9,7	Terre neuve	44	0,6
Berger allemand	408	5,7	Setter anglais	44	0,6
Caniche	396	5,5	Leonberg	42	0,6
Yorkshire terrier	366	5,1	Dalmatien	40	0,5
Golden retriever	334	4,6	Sharpei	40	0,5
Rottweiler	216	3,1	Braque allemand	38	0,5
Boxer	178	2,5	Dogue argentin	36	0,5
Bichon	178	2,5	Berger belge tervueren	36	0,5
Epagneul breton	162	2,3	Colley	34	0,5
Bouledogue français	144	2,0	Springer spaniel	32	0,4
Beauceron	138	1,9	Dogue allemand	32	0,4
Bouvier bernois	128	1,8	Griffon vendéen	32	0,4
Cocker anglais	116	1,6	Chihuahua	30	0,4
West Highland White terrier	92	1,3	Braque de Weimar	30	0,4
Lhassa apso	88	1,2	Shnauzer	30	0,4
Beagle	82	1,1	Drathaar	28	0,4
Border collie	82	1,1	Cane corso	28	0,4
Shi tzu	82	1,1	Berger australien	28	0,4
Jack ressel terrier	82	1,1	Scottish terrier	24	0,3
Teckel	78	1,1	Cocker américain	24	0,3
Cavalier King Charles	72	1,0	Chow chow	24	0,3
Malinois	70	1,0	Basset hound	24	0,3
Coton de tuléar	68	0,9	Bouledogue anglais	22	0,3
Doberman	60	0,8	Whippet	22	0,3
Husky	60	0,8	Saint bernard	20	0,3
Fox terrier	58	0,8	Setter irlandais	20	0,3
Bull terrier	58	0,8	Terrier du tibet	18	0,2
American stafforshire terrier	58	0,8	Akita inu	18	0,2
Berger des Pyrénées	56	0,8	Shetland	16	0,2
Pinscher	50	0,7	Spitz	14	0,2

Les races non mentionnées ici représentent moins de 0,1% des chiens présentés à la consultation.
Il y a 597 chiens de race non « définie », soit 8,3%.

Annexe 9 : Répartition des chiens de la population de référence en fonction de l'âge

Classe d'âge	Nombre de chiens	Pourcentage (%)	Classe d'âge	Nombre de chiens	Pourcentage (%)
Inconnu	346	4,8	9-10 ans	402	5,7
< 1an	1038	14,5	10-11 ans	408	5,8
1-2 ans	732	10,3	11-12 ans	350	4,7
2-3 ans	590	8,1	12-13 ans	270	3,7
3-4 ans	448	6,3	13-14 ans	196	2,7
4-5 ans	452	6,4	14-15 ans	106	1,5
5-6 ans	412	5,7	15-16 ans	68	0,9
6-7 ans	468	6,5	16-17 ans	28	0,4
7-8 ans	378	5,4	17-18 ans	8	0,1
8-9 ans	452	6,4	> 18 ans	8	0,1

Classification synthétique

Classe d'âge	< 2 ans	2-8 ans	> 8 ans	Inconnu	Total
Nombre de chiens	1 770	2 748	2 296	346	7 160
Pourcentage	24,7	38,4	32,1	4,8	100

Annexe 10 : Répartition en fonction du sexe des animaux de la population de référence

Sexe	Nombre de chiens	Pourcentage (%)
Mâle	3 726	52
Femelle	3 434	48

Annexe 11 : Caractéristiques épidémiologiques des 40 chiens de l'étude

Cas	Epidémiologie			Cas	Epidémiologie		
	race	A	S		race	A	S
1	Croisé	9	M	21	Dobermann	8,5m	M
2	Beagle	5	M	22	Croisé	9	F
3	Croisé	14	M	23	Braque portuguais	10	M
4	Beauceron	0,5	M	24	Cavalier King Charles	10	M
5	Labrador	2	F	25	Chien de berger	10	M
6	Labrador	12	M	26	Leonberg	5	F
7	Teckel	10	M	27	Braque allemand	12	F
8	Labrador	12	F	28	Beauceron	6	F
9	Rottweiler	6	M	29	Setter anglais	1,5	F
10	Am. Staff. Terrier	2	M	30	Dogue allemand	1	M
11	Labrador	3	M	31	Braque français	8	F
12	Beagle	9	M	32	Berger des Pyrénées	3	F
13	Am.Staff.Terrier	2	M	33	Bouledogue français	4	M
14	Springer spaniel	3	F	34	Croisé	12	F
15	Coton de Tuléar	12	F	35	Bichon	5	M
16	Berger allemand	2,5	M	36	Labrador	9	F
17	Caniche	14	F	37	Golden retriever	10	F
18	Shar pei	9	M	38	Croisé	1,5	M
19	Berger allemand	8	M	39	Dobermann	4	F
20	Bouvier bernois	6,5	M	40	Bichon	12	M

Annexe 12 : Motif de consultation et examen clinique des cas 1 à 10

Cas	Antécédents	Motif de consultation	Circonstances consultation	Durée évolution	Examen clinique
1	RAS	-Abattement -Anorexie -Polypnée	Analyses envoyées ENVL	2 j	-Ictère -Tachycardie -Abattement
2	RAS	-Abattement -Anorexie	Analyses envoyées ENVL	3 j	-Abattement - Hyperthermie -Pigmenturie
3	DAPP Cystite	-Mauvais EG	ENVL pour second avis	2 mois	-Abattement -Pâleur muqueuses -Douleur lombaire
4	Leptospirose et hépatite en cours depuis 15 jours	-Abattement -Anorexie	Consultation en 1ière intention ENVL	ND	-Abattement -Hyperthermie -Ictère
5	Piroplasmose 2 semaines avant	-Anorexie -Diarrhée -Vomissement -Abattement -Amaigrissement	Cas référé ENVL pour exploration anémie	1 sem	-Déshydratation 5% -Pouls faible -Tachycardie -Polypnée -Splénomégalie
6	Anémie par crises depuis 6 mois, traitée par cures de GC	-Abattement -Pigmenturie	Cas référé ENVL pour exploration anémie	6 mois	-Abattement -Pâleur des muqueuses -Souffle cardiaque -Ictère
7	RAS	-Abattement -Anorexie -Vomissement	Cas référé ENVL pour exploration anémie	5 j	-Abattement -Hyperthermie -Muqueuses pâles, ictériques -Souffle cardiaque -Polypnée -Hépatomégalie
8	Piroplasmose depuis 3 mois, pas de rémission malgré traitement	-Abattement -Anorexie -Vomissements -Pigmenturie	Analyses envoyées ENVL	épisodes récurrents depuis 3 mois	-Hyperthermie -Pigmenturie -Déshydratation à 5%
9	RAS	-Amaigrissement -Abattement -Faiblesse -Dysorexie -Diarrhée -PUPD	Consultation en 1ière intention ENVL	15 j	-mauvais EG -Maigreur -Abattement -Déshydratation 5% -Muqueuses pâles, subictériques -Œdème des membres - Douleur abdominale
10	RAS	Exploration ataxie vestibulaire centrale	Consultation en 1ière intention ENVL	24 h	-Abattement -Synd vestibulaire central -Subictère

Annexe 13 : Motif de consultation et examen clinique des cas 11 à 17

Cas	Antécédents	Motif de consultation	Circonstances consultation	Durée évolution	Examen clinique
11	Piroplasmose il y a 1,5 ans	-Abattement -Essouflement -Halitose	Cas référé ENVL pour exploration anémie	2 j	-Abattement -Muqueuses pâles, ictériques -Souffle cardiaque -Polypnée -Halitose -Ascite
12	Prostatite 1 semaine avant	-Abattement -Anorexie -Difficultés respiratoires	Cas référé ENVL pour exploration anémie	3 j	-Abattement -Déshydratation 8 % -Hypothermie -Tachycardie -Pouls bondissant -Muqueuses très pâles, subictériques -Souffle cardiaque -Dyspnée expiratoire
13	RAS	-Abattement	Analyses envoyées ENVL	1 j	-Ictère -Hépato-splénomégalie -Hypothermie (37,1°C) -Pigmenturie
14	Piroplasmose il y a 1 an	-Abattement -Pigmenturie	Cas référé ENVL pour exploration anémie	4 jours	-Abattement -Muqueuses pâles, subictériques -Déshydratation 6% -Souffle cardiaque
15	RAS	-Abattement -Anorexie -Faiblesse	Consultation en 1ière intention ENVL	24 h	-Abattement -Muqueuses pâles, ictériques -Hyperthermie -Adénomégalie mandibulaire et préscapulaire -Toux sèche, Bruits respiratoires ↑ -Pouls bondissant
16	RAS	-Abattement -Dysorexie -Polydipsie -pigmenturie	Consultation en 1ière intention ENVL	3 j	-Abattement -Hyperthermie
17	RAS	-Abattement -Hématurie	Cas référé ENVL pour exploration anémie	24h	-Abattement -Maigreur -Déshydratation 3% -Muqueuses pâles et ictériques -Arythmies et souffle cardiaques -Hyperthermie

Annexe 14 : Motif de consultation et examen clinique des cas 18 à 25

Cas	Antécédents	Motif de consultation	Circonstances consultation	Durée évolution	Examen clinique
18	Diarrhée chronique depuis 1 an	Exploration diarrhée chronique	Exploration diarrhée chronique	ND	-Cachexie -Hyperthermie -Déshydratation 5% -Muqueuses pâles -Souffle cardiaque
19	RAS	-Abattement -PUPD -Anorexie -Ptyalisme	Consultation en 1ière intention ENVL	48 h	-Abattement -Muqueuses pâles -Souffle et arythmies cardiaques -Tachycardie -Palpation abdo douloureuse -Signe du flot -Organomégalie
20	-Amaigrissement depuis 3 mois -Episodes d'hyperthermie -Dysorexie	-Abattement -Polydipsie	Cas référé pour exploration abattement	3 mois	-Abattement -Hyperthermie -Muqueuses pâles, subictériques -Tachycardie -Souffle cardiaque -Polypnée -NL préscapulaires et poplités ↑
21	Troubles dermatologiques	-Dysorexie -Exploration troubles dermato	Exploration troubles dermatologiques	ND	-Abattement -Pétéchies sur muqueuses -Troubles dermato
22	Ovario-hystérectomies 15 jours avant	-Abattement -Dysorexie -Polydipsie	Consultation en 1ière intention ENVL	15 j	-Abattement -Hyperthermie -Muqueuses pâles -Râles pulmonaires
23	-Constipation -Prostatite 4 jours avant	-Abattement -Hyperthermie -Difficultés locomotrices	Consultation en 1ière intention ENVL	4 j	-Abattement -Hyperthermie -Bruits respiratoires ↑ -Dyspnée inspiratoire -Polyarthralgie -Douleur manipulation cou et jonction thoraco-lombaire -Palpation abdo douloureuse -NL préscapulaires et poplités ↑
24	ND	ND	Analyses envoyées ENVL	ND	ND
25	-Fistules anales -Exérèse carcinome épidermoïde 10 j avant	-Déhiscence plaie chirurgicale -Abattement	Consultation à l'ENVL	ND	-Abattement -Muqueuses pâles

Annexe 15 : Motif de consultation et examen clinique des cas 26 à 34

Cas	Antécédents	Motif de consultation	Circonstances consultation	Durée évolution	Examen clinique
26	RAS	-Episodes abattement, amaigrissement depuis 2 mois -Cytopénies persistantes	Cas référé pour exploration cytopénies persistantes	2 mois (évolution par crises)	-Fatiguabilité -Polypnée -Muqueuses pâles
27	Piroplasmose depuis 2 mois, pas de guérison avec traitement	-Abattement -Diarrhée	Analyses envoyées ENVL	épisodes récurrents depuis 2 mois	-Abattement -Muqueuses pâles -Maigreur
28	Pyodermite profonde	-Abattement -Dysorexie	Consultation en dermatologie	1 mois	-Abattement -Amyotrophie -Polyadénomégalie
29	Crises d'hyperthermie depuis 1 an	-Abattement -Dysorexie -Hyperthermie -Troubles locomoteurs	Cas référé pour exploration hyperthermie récurrente	1 an (evolution par crises)	-Abattement -Hyperthermie -Muqueuses très pâles -Pouls bondissant -Douleur percussion rachis thoraco-lombaire -Bruits respi ↑
30	RAS	-Abattement -Dysorexie -Hyperthermie	Consultation en 1ière intention ENVL	24 h	-Hyperthermie -Tachycardie
31	RAS	-Abattement -Fatigabilité à l'effort	Cas référé pour exploration anémie	15j	-Muqueuses pâles -Fatigabilité
32	-Hypothyroïdie -Troubles neurologiques (maladie de surcharge)	-Dysorexie -Amaigrissement -Diarrhée -Polydipsie	Cas référé pour exploration pancytopénie	1 sem	-Hyperthermie -Muqueuses pâles -Polypnée
33	Episodes d'abattement depuis plusieurs mois rétrocédant sous GC	-Abattement -Anorexie -Adipsie	Consultation en 1ière intention ENVL	5 j	-Abattement -Hypothermie -Muqueuses pâles, subictériques
34	-Exérèse tumeur mammaire -Collapsus trachéal	-Abattement -PUPD -Amaigrissement	Cas référé pour exploration anémie	2 sem	-Maigreur -Déshydratation à 5% -Hypothermie -Abattement -Muqueuses très pâles -Souffle cardiaque -Tachycardie

Annexe 16 : Motif de consultation et examen clinique des cas 35 à 40

Cas	Antécédents	Motif de consultation	Circonstances d'évolution	Durée évolution	Examen clinique
35	RAS	Syncope	Cas référé pour exploration anémie	4 j	-Hyperthermie -Muqueuses pâles, subictériques -Pétéchies sur muqueuses -Polypnée
36	RAS	-Anorexie -Adipsie -Hyperthermie -Polypnée -Pigmenturie -Abattement	Consultation en 1ière intention ENVL	2 j	-Hyperthermie -Abattement -Muqueuses ictériques -Polypnée -Palpation abdominale douloureuse
37	Paralysie faciale G 3 ans avant	Troubles neurologiques (dysphagie, dysdipsie)	Consultation en neurologie	10 j	-Déshydratation à 5% -Souffle cardiaque -Bradycardie -Polyneuropathie
38	RAS	-Abattement -Hématurie -Anorexie	Consultation en 1ière intention ENVL	24 h	-Abattement -Hyperthermie
39	RAS	-Troubles digestifs persistants depuis 2 mois -Epistaxis -Polydipsie -Troubles dermatologiques	Cas référé pour exploration anémie	1 m	-Hyperthermie - Muqueuses pâles, subictériques -NL préscapulaires et poplités ↑ -Troubles dermatologiques
40	RAs	Abattement	Consultation en 1ière intention ENVL	10 j	-Abattement -Pétéchies sur muqueuses, hématomes -Muqueuses pâles -Saignements buccaux -Souffle cardiaque

Annexe 17 : Traitements antérieurs aux prélèvements sanguins

Cas	*Molécule*	*Classe thérapeutique*	*Durée TT*	*Posologie*	*Durée avant analyse sanguine (Début TT)*
3	-Méloxicam	-AINS	3 j	0,1 mg/kg/j	2 mois
	-Lespedeza capitata	-Diurétique doux	5 j		
5	-Imidocarbe	-Antiparasitaire	-2 injections à 48h d'intervalle	0,25 mL/10 kg	-3 sem
	-Prednisone	AIS	6 j	-1 mg/kg/j puis 0,5 mg/kg/j	-2 sem
6	ND	AIS	1 injection		24 h
7	Doxycycline	Antibiotique	ND	ND	48 h
	Imidocarbe	Antiparasitaire	1 injection	0,25 mL/10 kg	
	Acide tolfénamique	AINS		ND	
		AIS	1 inj	ND	
8	Imidocarbe	Antiparasitaire	1 inj	0,25 mL/10 kg	1,5 m
	Doxycycline	Antibiotique	1 m	10 mg/kg/j	
12	Prednisone	AIS	3 j	0,5 mg/kg	24 h
	Marbofloxacine	Antibiotique	10 j	2 mg/kg/j	
14	Imidocarbe	Antiparasitaire	1 inj	0,25 mL/10 kg	3 j
	Amoxicilline	Antibiotique	5 j	20 mg/kg/j	3 j
	Vitamine C				2 j
	Méthylprednisolone	AIS	2 inj à 48 h d'intervalle	2 mg/kg	3 j
17	Méthylprednisolone	AIS	1 inj	2 mg/kg	5 h
	Imidocarbe	Antiparasitaire	1 inj	0,25 mL/10 kg	
	Marbofloxacine	Antibiotique	5 j	2 mg/kg/j	
	Amoxicilline	Antibiotique	1 inj	15 mg/kg	
20	Amoxicilline	Antibiotique	8 j	20 mg/kg/j	1 m
22	Amoxicilline + Ac.clavulanique	Antibiotique	7 j	25 mg/kg/j	15 j
	Meloxicam	AINS	3 j	0,1 mg/kg/j	
	Fenspiride	Anti-tussif	10 j	6 mg/kg/j	
23	Amoxicilline + Ac.clavulanique	Antibiotique	10 j	25mg/kg/j	3 j
	Meloxicam	AINS	5 j	0,1 mg/kg/j	
	Sulfamide + TMP	Antibiotique	10 j	25 mg/kg/j	
	Finastéride	Action sur système reproducteur			

Annexe 18 : Traitements antérieurs aux prélèvements sanguins

Cas	*Molécule*	*Classe thérapeutique*	*Durée TT*	*Posologie*	*Durée avant analyse sanguine (Début TT)*
25	Clindamycine	Antibiotique	10 j		1 m
	Etamsylate	Anti-hémoragique	3 j		
		AIS	15 j		
26	Doxycyline	Antibiotique	10 j	10 mg/kg/j	2 sem
	Méthylprednisolone			0,5 mg/kg/j	
27	Imidocarbe	Antiparasitaire	1 inj	0,25 mL/10 kg	3 m
	Doxycycline	Antibiotique	1 m	10 mg/kg/j	1 m
	Déxaméthasone	AIS	2 inj	1 mg/kg	2 m
28	Céfalexine	Antibiotique	3 sem	30 mg/kg/j	3 sem
	Kétoconazole	Antifongique	3 sem	10 mg/kg/j	
	Sélamectine	Antiparasitaire	2 applications	6 mg/kg	
29	Prednisolone	AIS	1 m	0,3 mg/kg/j	2 m
	Doxycycline	Antibiotique	10 j	10 mg/kg/j	6 m
	Ac.tolfénamique	AINS	1 inj	4 mg/kg	2 m
	Spiramycine + métronidazole	Antibiotique	8 j	100 000 UI/kg/j spiramycine + 16,7 mg/kg/j métronidazole	2 m
	Amoxicilline	Antibiotique	8 j	20 mg/kg/j	2 m
31	Prednisolone	AIS	15 j	0,1 mg/kg/j	10 j
32	Phénobarbital	Anticonvulsivant	A vie	5 mg/kg/j	4 m
	Lévothyroxine sodique	Hormone thyroïdienne	A vie	40 µg/kg/j	3 ans
34	Méthylprednisolone	AIS	7 j	1 mg/kg/j puis 0,5 mg/kg/j	13 j
	Amoxicilline LA	Antibiotique retard	1 inj	15 mg/kg	13 j
	Imidocarbe	Antiparasitaire	1 inj	0,25 mL/10 kg	20 j
35	Imidocarbe	Antiparasitaire	1 inj	0,25 mL/10 kg	1,5 m
	Amoxicilline	Antibiotique	7 j	20 mg/kg/j	
	Déxaméthasone	AIS	7 j	0,1 mg/kg/j	
37	Prednisone	AIS	10 j	2 mg/kg/j	15 j
	Céfalexine	Antibiotique		30 mg/kg/j	
39	Vitamine B12		10 j		1 m
	Lespedeza capitata	-Diurétique doux			

Annexe 19 : Paramètres hématologiques cas 1 à 15

Cas	Durée évolution	Hgb g/dL	Ht %	GR	réticulocytes	VGM fl	CCMH g/dL	TCMH Pg/dL	GB	Plaquettes	Anomalies constatées
1	24 h	3.5	10.8		21 000				43 700	208 000	-Anémie arégénérative -Leucocytose importante
2	2 j	4.5	13.8	1.69	87 880	82	32.5	26.5	5 600	110 000	- Anémie régénérative, macrocytaire, normochrome -Thrombopénie légère -Leucopénie modérée
3	2 mois	9.2	27.4	4.28	29 960	64	33.5	21.5	5 500	263 000	- Anémie arégénérative, normocytaire, normochrome -Leucopénie modérée
4	ND	8.9	24.5	3.74	41 140	65	36.6	23.9	13 500	83 000	- Anémie arégénérative, normocytaire, normochrome -Thrombopénie modérée
5	1 sem	6.2	12.9	1.73	279 000	75	47.7	35.6	46 200	39 000	- Anémie régénérative, normocytaire, normochrome -Thrombopénie sévère -Leucocytose importante
6	6 m	3.4	9.2	1.3	62 400	71	36.4	25.9	42 200	50 000	-Anémie régénérative, normocytaire, normochrome -Thrombopéne sévère -Leucocytose importante
7	5 j	5.8	16.9	2.36	306 800	72	34.6	24.8	38 000	160 000	-Anémie régénérative, normocytaire, normochrome -Thrombopéne légère -Leucocytose importante
8	3 m	9.7	28.6	4		72	34	24.3	25 300	200 000	-Anémie normocytaire normochrome -Leucocytose
9	15 j	7.5	22.4	3.42	17 100	65	33.6	22	12 200	118 000	-Anémie arégénérative normocytaire, normochrome -Thrombopénie légère
10	24 h	10.1	21.3	2.69	96 840	79	47.5	37.8	24 800	294 000	-Anémie régénérative, macrocytaire, normochrome -Leucocytose
11	2 j	5.4	16.6	1.94	582 000	86	32.5	27.8	13 600	280 000	Anémie régénérative macrocytaire normochrome
12	3 j	3.5	8	0.89	178 000	90	43.8	39.6	52 500	281 000	-Anémie régénérative macrocytaire normochrome -Leucocytose importante
13	24 h	4.9	10.3	1.35	148 500	76	47.2	36	26 300	91 000	-Anémie régénératrive macrocytaire normochrome -Thrombopénie modérée -Leucocytose
14	4 j	5.1	13.9	1.91	198 640	73	36.5	26.7	39 400	157 000	-Anémie régénérative normocytaire normochrome -Thrombopénie légère -Leucocytose importante
15	24 h	5.4	13.1	1.95	62 400	67	41.3	27.7	20 400	120 000	-Anémie régénérative normocytaire normochrome -Thrombopénie légère -Leucocytose

Annexe 20 : Paramètres hématologiques cas 16 à 31

Cas	Durée évolution	Hgb g/dL	Ht %	GR	réticulocytes	VGM fl	CCMH g/dL	TCMH Pg/dL	GB	Plaquettes	Anomalies constatées
16	3 j	10.9	28.2	4.29	0	66	38.7	25.4	7 200	50 000	-Anémie arégénérative normocytaire normochrome -Thrombopénie sévère
17	24 h	7.6	20	2.79	100 440	72	37.8	27.1	29 400	220 000	-Anémie régénérative normocytaire normochrome -Leucocytose
18	ND	8.1	23.5	3.79	3 790	62	34.3	21.3	17 800	642 000	-Anémie arégénérative normocytaire normochrome -Leucocytose -Thrombocytose
19	48 h	8.7	25.9	3.79	390 370	68	33.5	22.9	40 600	80 000	-Anémie régénérative normocytaire normochrome -Thrombopénie modérée -Leucocytose importante
20	3 m	4.9	15.1	1.95	132 600	77	32.2	24.9	28 400	33 000	-Anémie régénérative macrocytaire normochrome -Thrombopénie sévère -Leucocytose
21	ND	10.5	31.5	4.82	9 640	65	33.2	21.7	20 600	218 000	-Anémie arégénérative normocytaire normochrome -Leucocytose
22	15 j	5.2	14.2	2.2	246 400	64	36.5	23.5	17 400	240 000	Anémie régénérative normocytaire normochrome
23	4 j	9.7	23.9	3.65	3 650	65	40.7	26.6	49 500	477 000	-Anémie arégénérative normocytaire normochrome -Leucocytose importante
24	ND	6.9	21.3	2.8	140 000	76.1	32.4	24.6	7 400	200 000	Anémie régénérative macrocytaire normochrome
25	ND	9.4	28.4	3.76	639 200	76	33.1	25	34 300	137 000	-Anémie régénérative normocytaire normochrome -Thrombopénie légère -Leucocytose
26	2 m	10.9	31.2	4.92	24 600	64	34.8	22.1	4 300	139 000	-Anémie arégénérative normocytaire normochrome -Thrombopénie légère -Leucopénie
27	2 m	10.9	27.8	5.14		ND	ND	ND	59 290	190 000	-Anémie -Leucocytose importante -Thrombopénie légère
28	1 m	10.6	30.1	4.27	8 540	71	35	24.7	5 700	325 000	Anémie arégénérative normocytaire normochome
29	1 an	7.7	22.6	3.35	6 700	67	34	22.9	9 900	150 000	-Anémie arégénérative normocytaire normochrome -Thrombopénie légère
30	24 h	11.5	34.6	4.98	0	70	33.1	23.1	3 300	34 000	-Anémie arégénérative normocytaire normochrome -Thrombopénie sévère -Leucopénie

Annexe 21 : Paramètres hématologiques cas 32 à 40

Cas	Durée évolution	Hgb g/dL	Ht %	GR	réticulocytes	VGM fl	CCMH g/dL	TCMH Pg/dL	GB	Plaquettes	Anomalies constatées
31	15 j	4.4	13.2	1.75	35 000	75	33.6	25.3	12 900	480 000	-Anémie arégénérative normocytaire normochrome
32	1 sem	7.1	20.6	3.03	93 930	68	34.6	23.4	2 800	172 000	-Anémie régénérative normocytaire normochrome -Thrombopénie légère -Leucopénie
33	5 j	5.2	14.6	2.08	27 040	70	35.6	25	11 100	200 000	Anémie arégénérative normocytaire normochrome
34	2 sem	2.9	8.2	1.46	7 300	56	35.8	20.1	24 700	2 000 000	-Anémie arégénérative normocytaire normochrome -Thrombocytose -Leucocytose
35	4 j	8.3	25.8	3.23	264 860	80	32.1	25.7	24 200	250 000	-Anémie régénérative macrocytaire normochrome -Leucocytose
36	2 j	5.1	13.7	1.91	5 730	72	37.5	26.9	9 800	36 000	-Anémie arégénérative normocytaire normochrome -Thrombopénie sévère
37	10 j	11	32.8	4.69	4 890	67	33.5	22.5	9 300	180 000	-Anémie arégénérative normocytaire normochrome -Thrombopénie légère
38	24 h	9.6	27	4.11	32 880	66	35.4	23.3	7 000	65 000	-Anémie arégénérative normocytaire normochrome -Thrombopénie modérée
39	1 m	8.7	25.3	3.78	3 780	67	34.5	23.1	5 200	242 000	Anémie arégénérative normocytaire normochrome
40	10 j	4	10.3	1.38	63 680	74	38.9	28.9	40 900	150 000	-Anémie régénérative macrocytaire normochrome -Thrombopénie légère -Leucocytose

Annexe 22 : Commentaires frottis sanguin

Cas	RF	AE	Polych.	Erythrob.	Auto-agg.	Sphér.	Divers	Agents infectieux
1		++	+	+++	+	+	PNN immatures	
2	+	+	+			+	-image érythrophagocytose -lymphocytes granuleux	piroplasmes
3	+	+					Echinocytes, Accanthocytes	
4	+	+				+		
5		+			+	+		
6	+	+	+			+		
7		+	+	+++	+		Qq corps de Howell Joly	
8								piroplasmes
9		+					Lymphocytes granuleux	
10		+		+	+	+		
11		+	+	+	+		Qq corps de Howell Joly	
12		+	+	+	+	+	-Corps de Howell Joly -PNN immatures	
13		+	+	+		+		
14		+	+		+	+	-Corps de Howell Joly -PNN immatures	
15		+	+	+	+	+		
16	+	+				+	Lymphocytes granuleux	piroplasmes
17	+	+	+	+		+	PNN immatures	
18		+			+	+	PNN hypersegmentés	
19		+	+	+			-Acanthocytes, échinocytes -PNN immaturess	
20		+	+	+++			Qq corps de Howell Joly	
21	+							
22	+	++	+	+				
23	+	+					-Qq lymphocytes granuleux -Qq monocytes	
24		+	+	+		+		
25								
26		+						-rares piroplasmes -1 morula d'Ehrlichia dans 1 plaquette -1 morula d'Ehrlichia dans 1 PNN
27								piroplasmes
28								
29	+	+				+	Lymphocytes granuleux	
30	+	+					Lymphocytes granuleux	Piroplasmes
31		+			+	+	Anisocytose plaquettaire	
32		+		+++			Lymphocytes à grand cytoplasme	
33	+	+					Rares lymphocytes granuleux	
34	+	+						
35		+	+	+++	+		Lymphocytes à grand cytoplasme clair	
36		+					Lymphocytes granuleux	
37	+	+					-PNN immatures -Nombreux monocytes	
38		+						Nombreux piroplasmes
39		+						
40		+	+		+	+		

Annexe 23 : Résultats tests de Coombs

Cas	TCD chaud	TCD froid	TCI	Commentaire	Cas	TCD chaud	TCD froid	TCI	Commentaire
1	NR	NR	NR		21	++ (1/512)	NR	+ (1/4)	AHAI
2	+ (1/8)	NR	+ (1/8)	AHAI	22	-	+ (1/8)	NR	
3	+ (1/16)	+ (1/32)	+ (1/4)	AHAI	23	+ (1/8)	+ (1/8)	+ (1/8)	AHAI
4	+ (1/8)	NR	+ (1/8)	AHAI	24	+ (1/8)	+ (1/16)	+ (1/16)	AHAI
5	NR	NR	NR		25	NR	NR	NR	
6	++ (1/256)	NR	-	AHMI	26	+ (1/16)	+ (1/16)	NR	
7	++ (1/64)	NR	+ (1/4)	AHAI	27	+ (1/16)	NR	NR	
8	+ (1/8)	-	+ (1/8)	AHAI	28	-	+ (1/16)	+ (1/8)	AHAI Réactivité à froid
9	+ (1/16)	+ (1/16)	-	AHMI	29	NR	NR	NR	
10	+ (1/8)	++ (1/512)	+ (1/4)	AHAI	30	-	+ (1/8)	NR	
11	+ (1/32)	++ (1/64)	+ (1/16)	AHAI	31	-	-	NR	
12	++ (1/512)	NR	++ (1/1024)	AHAI	32	-	+ (1/32)	NR	Réactivité à froid
13	++ (1/64)	NR	+ (1/4)	AHAI	33	+ (1/16)	NR	+ (1/16)	AHAI
14	++ (1/64)	NR	-	AHMI	34	+ (1/32)	NR	+ (1/4)	AHAI
15	+++ (1/16 224)	NR	+ (1/4)	AHAI	35	+++ (1/2048)	NR	+ (1/4)	AHAI
16	NR	NR	NR		36	++ (1/512)	NR	++ (1/512)	AHAI
17	+++ (1/16 324)		+ (1/28)	AHAI	37	+ (1/16)	NR	+ (1/8)	AHAI
18	-	-	NR		38	+ (1/32)	NR	NR	
19	+ (1/8)	NR	+ (1/8)	AHAI	39	-	+ (1/16)	++ (1/64)	AHAI Réactivité à froid
20	-	+ (1/8)	-	AHMI Réactivité à froid	40	-	-	-	

Annexe 24 : Résultats analyse urinaire

Cas	pH	Du	Sang	Bilirubine	Protéines	Culot
3	5	1.034	1+	2+	3+	
5	7	1.050	1+	3+	-	
6	5.5	1.028	2+	3+	2+	
7	6.5	>1.050	4+	3+	1+	
9	5	1.040	1+	3+	2+	
10	7	1.035	3+	3+	-	hémoglobine
12	8	1.028	2+	3+	1+	
16	6	>1.050	4+	3+	-	GR
18	5.5	>1.050	-	-	2+	
20	8	1.028	-	3+	1+	
22	7	1.010	-	-	-	
28	7	1.050	-	2+	1+	
29	7	>1.050	1+	2+	1+	hémoglobine
30	6.5	1.040	2+	-	1+	hémoglobine
32	6	1.020	1+	1+	1+	
33	6	>1.050	4+	3+	1+	hémoglobine
34	5.5	>1.050	4+	4+	4+	
36	7	1.028	4+	2+	2+	hémoglobine
38	6	>1.050	4+	3+	3+	
39	6	1.028	2+	-	3+	
40	5.5	1.030	1+	-	-	

Annexe 25 : Résultats examens complémentaires cas 1 à 19

Cas	Sérologies/PCR	Biochimie	Imagerie	Autres examens complémentaires
1		-Urée/Créat/Pal/AlAT/PT : N -Bilirubinémie ↑	Echo abdo ▶ RAS	
2		Urée/Créat/Pal/AlAT : N		
3	Leishmaniose : -			
4	PCR leptospirose : +	Urée/Créat/PAl/AlAT ↑	Echo abdo ▶ hyperéchogénicité rénale, signes hépatite	
5		Ionogramme : N	-Radio thorax ▶ RAS -Echo abdo ▶ RAS	-ECG ▶ RAS -Tps saignement : N
6		-Plasma ictérique -Urée ↑/Créat : N -Pal ↑/AlAT ↑↑	Echo abdo ▶ hypoéchogénicité foie	
7		-Urée/Créat/AlAT/Alb/PT : N - PAl ↑ -Bilirubinémie ↑	Echo abdo ▶ hépatomégalie, splénomégalie	-Tps saignement : N
8		Urée/Créat/Pal/AlAT : N		
9	Leishmaniose : -	-PAl/AlAT ↑ -Alb ↓		-RPCU ↑ -Copro : sarcocystis
10	Leptospirose : + Leishmaniose : -	-AlAT/PAl/Ac biliaires/NH3 ↑ -Bilirubinémie ↑	Echo abdo ▶ hyperéchogénicité foie et séreuses, épaississement paroi TD	-Bilan hémostase : N
11	Leptospirose : -	-Bilirubinémie ↑	Echo abdo ▶ épanchement abdo (Transsudat), splénomégalie	-Bilan hémostase : N -Dosage Acan : -
12			-Radio thorax ▶ RAS -Echo abdo ▶ RAS	-Tps de coag sur TS : N
13				
14		-Urée ↑/Créat : N -PAl ↑/AlAT : N -bilirubinémie ↑ -ionogramme : hypokaliémie		
15		-PAl/AlAT : N	-Radio thorax ▶ RAS -Echo abdo ▶ RAS	
16				
17		-Urée ↑/Créat : N -PAl/AlAT/PT : N -Ionogramme : hypokaliémie	-Radio thorax ▶ RAS -Echo abdo ▶ pancréatite, duodénite, stase gastrique, péritonite	
18		- Urée/Créat/AlAT/PAl/Alb/PT : N -Bilirubinémie : N		Laparotomie exploratrice + biopsies TD : infiltration inflammatoire TD de type immuno-allergique + polypose hyperplasique
19			-Echo abdo ▶ épanchement abdo (hémoabdomen), rate mitée + nodules -Echo cardio ▶ Nodule atrium droit	Cytologie épanchement : hémangiosarcome

Annexe 26 : Résultats examens complémentaires cas 20 à 28

Cas	Sérologies/PCR	Biochimie	Imagerie	Autres examens complémentaires
20	Borréliose : -	-Urée/Créat/Pal/AlAT/Chol : N -bilirubinémie ↑	-Radio thorax ▶adénomégalie sternale, trachéo-bronchique et médiastinale craniale -Echo abdo ▶splénomégalie + nodules	Cytologie prélèvement de rate : histiocytose systémique
21		-Urée/Créat/PAl/AlAT : N -bilirubinémie : N		-Dosage Acan : - -Biopsies cutanées : pemphigoïde bulleuse -Bilan hémostase : N
22		Urée/Créat/Pal/AlAT/PT : N	-Radio thorax ▶RAS -Echo cardio ▶RAS	-Bilan hémostase : N -Copro : -
23	Leishmaniose : -		-Echo abdo ▶RAS -Radio rachis ▶RAS -Radio articulaire ▶RAS -Echo cardio ▶RAS	-Cytologie articulations : arthrite neutrophilique aseptique -RPCU ↑ -Hémoculture : RAS -Adénogramme : hyperplasie plasmocytaire non significative -Culot urinaire :RAS -Dosage Acan : + (1/64) -Electrophorèse protéines : phénomène inflammatoire
24				
25				
26	-Leishmaniose : - -Borréliose : - -Herpesvirose : -			-Electrophorèse protéines : phénomène inflammatoire chronique -Bilan hémostase : N
27		-Urée ↑/Créat : N -PAl ↑/AlAT : N		
28	PCR leishmaniose : -			-Electrophorèse protéines : pic β2 non spécifiifique -Adénogramme : adénite réactionnelle (pyodermite) -Dosage Acan : -

Annexe 27 : Résultats examens complémentaires cas 29 à 40

Cas	Sérologies/PCR	Biochimie	Imagerie	Autres examens complémentaires
29		Urée/Créat/PAl/AlAT : N	-Echo abdo ►RAS -Radio thorax ►cardiomégalie droite, opacification focale broncho-intersticielle lobe caudal gauche -Echo cardio ►RAS	-Dosage Acan : - -ECBU : RAS -Copro : - -Electrophorèse protéines : processus inflammatoire ou état fébrile -Vitesse de sédimentation : processus inflammatoire marqué
30				
31	Leishmaniose : -	-AlAT/Trig/Chol/Urée/Créat/PT : N -PAl ↑ - bilirubinémie : N	-Echo abdo ►RAS -Radio thorax ►RAS -Radio abdo ►RAS	
32		-Urée/Créat/AlAT : N -PAl ↑ -ionogramme : N	-Radio thorax ►RAS -Echo abdo ►splénomégalie, hyperéchogénicité mésentère	
33		-Urée/Créat/PAl/AlAT : N -bilirubinémie ↑ -PT↓		
34		-Urée/Créat/PAl/AlAT/PT : N -T4 : N -ionogramme: N		Dosage Acan : + (1/1024)
35	-Leishmaniose : - -Néosporose : -	-Urée/Créat/PAl/AlAT/PT/Alb : N -bilirubinémie ↑		
36	Leptospirose : -	-Urée/Créat/AlAT/lactates : N -PAl ↑	Echo abdo ►splénomégalie	-Bilan hémostase II : N
37		-ionogramme : hypokaliémie, hypernatrémie -T4/TSH : comp.hypothyroïdie -Urée ↑/Créat N -PT ↑/Chol/Trig : N	-Radio thorax ►RAS -Echo abdo ►splénomégalie	-Tps de saignement : N -Ponction de LCR : processus inflammatoire
38		-Urée ↑/Créat : N -PAl /AlAT : N		
39	Leishmaniose : +	-Urée ↑/Créat↑ -PAl/AlAT/PT : N -ionogramme : phosphates ↑, Ca : N		-RPCU ↑ -Tps de saignement : N -Adénogramme : adénite granulomateuse leishmanienne
40		-bilirubinémie : N	Echo abdo ►RAS	ECBU : ITU

Annexe 28 : Données myélogramme

Cas	Lignée érythroïde	Lignée myéloïde	Lignée mégacaryocytaire	Populations accessoires
3	lignée érythroïde minoritaire dominée par des stades de maturation avancés présentant des signes de dysplasie modérée de type immun	hyperplasie médullaire myéloïde en faveur neutropénie périphérique	mégacaryocytose ++ à mégacaryocytes parfois légèrement dysplasiques	-Volumineux nids d'histiocytes d'aspect souvent épithélioïde sans mise en évidence d'agents figurés -mortalité intra-médullaire importante des lignées hématopoïétiques
20	Lignée érythroïde essentiellement représentée par des stades de maturation avancé avec présence de quelques signes de dysplasie de type immun	Lignée myéloide représentée par des stades de maturation avancé sans évidence de stimulation évidence	Mégacaryocytose ++ à mégacaryocytes sans anomalies	syndrome hémophagocytaire marqué
23	lignée érythroïde très hypoplasique représentée essentiellement par quelques stades de maturation avancée sans atypies cytonucléaires majeures	très importante hyperplasie myéloïde avec conservation de la pyramide de maturation	mégacaryocytose +++ à mégacaryocytes à tous stades sans anomalie	RAS
28	lignée érythroïde bien représentée avec conservation de la pyramide de maturation mais présence de signes de dysplasie sur la lignée érythroïde (en particulier tendance à la macroblastose)	lignée myéloïde bien représentée avec conservation de la pyramide de maturation	hémodilution donc évaluation mégacaryocytos imprécise, mégacaryocytes paraissent rares (pas de thrombopénie)	-présence d'une nette monocytose (15 %) sans mise en évidence de parasites intra-cellulaires - images d'érythro ou d'érythroblastophagocytose
29	lignée érythroïde très hyperplasique avec augmentation des stades jeunes mais observation de signes de dysplasie marquée au fur et à mesure de la maturation de la lignée	lignée myéloïde hyperplasique avec augmentation des stades jeunes et conservation de la pyramide de maturation sans anomalies franches	mégacaryocytose +++ à mégacaryocytes à tous stades, certains présentant des signes de dysplasie sévère	-contingent monocytaire bien représenté souvent peu mature - mortalité érythroïde intra médullaire très importante.
31	très importante hyperplasie érythroïde avec prédominance des stades d'érythroblastes polychromatophiles avec présence de signes de dysplasie nets apparaissant sur ces stades,	lignée myéloïde minoritaire non stimulée sans anomalie significative	mégacaryocytose +++ à dominante de mégacaryocytes matures thrombocytogènes, associés à de volumineux amas plaquettaires, signes de dysplasie nets sur certains éléments et signes d'activation sur d'autres	-nombreux nids d'histiocytes associés à des plasmocytes matures sans mise en évidence de parasites intra-cellulaires - images d'érythrophagocytose et d'érythroblastophagocytose

Annexe 29 : Données myélogramme

Cas	Lignée érythroïde	Lignée myéloïde	Lignée mégacaryocytaire	Populations accessoires
32	lignée érythroïde très minoritaire représentée essentiellement par des stades de maturation avancée d'érythroblastes polychromatophiles et acidophiles présentant également des signes fréquents de dysplasie de type immune.	lignée myéloïde très largement majoritaire caractérisée par une nette déviation à gauche et désertification du stade des polynucléaires neutrophiles matures corrélée à la neutropénie enregistrée, mais sans signes de dysplasie francs	mégacaryocytose +++ avec conservation pyramide de maturation, quelques rares éléments avec signes de dysplasie	RAS
33	Très importante hyperplasie érythroïde avec augmentation des stades jeunes et conservation de la pyramide de maturation sans signes évidents de dysplasie	Lignée granuleuse normale minoritaire	Mégacaryocytose +++ à mégacaryocytes à tous stades sans anomalie	Présence de très nombreux histiocytes hémosidérophages suggérant une hyperhémolyse intra-médullaire intense
34	lignée érythroïde essentiellement représentée par des érythroblastes acidophiles ou polychromatophiles sans signes de dysplasie majeurs.	population myéloïde majoritaire à dominante de polynucléaire neutrophiles matures	échantillon restreint, les quelques mégacaryocytes observés montrent des signes de dysplasie constants plutôt de type immun	contingent lymphoïde bien représenté (à petites cellules à cytoplasme souvent basophile semblant en transformation plasmocytaire) et assez nombreux plasmocytes
36	lignée érythroïde très hyperplasique avec conservation de la pyramide de maturation, présence de quelques signes de dysplasie nette sur une partie du contingent des érythroblastes polychromatophiles	lignée granuleuse à priori normale avec nette représentation du contingent des éosinophiles	mégacaryocytose +++ avec augmentation nette du contingent de mégacaryocytes jeunes en faveur d'une stimulation récente intense de la lignée, sans signes de dysplasie majeure.	RAS
37	lignée érythroïde très largement majoritaire avec conservation de la pyramide de maturation et signes de dysplasie mineure de type immun essentiellement cytoplasmique.	lignée myéloïde très minoritaire non stimulée	mégacaryocytose ++ à +++, mégacaryocytes souvent très fortement activés	-importante infiltration médullaire par un contingent histiocytaire -plasmocytose quantitativment modérée mais à plasmocytes presque systématiquement enflammés
39	lignée érythroïde relativement peu stimulée face à l'anémie signalée représentée essentiellement par des stades matures d'érythroblastes polychromatophiles et acidophiles sans atypies significatives.	lignée myéloïde normale	mégacaryocytose + à mégacaryocytes normaux	nette lympocytose (26%) et à moindre degré plasmocytose (7%). Présence de plusieurs nids d'histiocytes contenant des leishmanies.

Annexe 30 : Causes sous-jacentes identifiées et méthodes diagnostiques

Cas	Cause sous-jacente	Méthode diagnostique	Cas	Cause sous-jacente	Méthode diagnostique
2	Piroplasmose	Frottis sanguin	21	Pemphigoïde bulleuse	Biopsie cutanée
4	Leptospirose	PCR	26	Piroplasmose + Ehrlichiose à E.canis	Frottis sanguin, sérologie
8	Piroplasmose	PCR, frottis sanguin	27	Piroplasmose	PCR, Frottis sanguin
9	Ehrlichiose à E.canis	Sérologie	29	Ehrlichiose à E.canis	sérologie
10	Leptospirose	Sérologie (séroconversion)	30	Piroplasmose	Frottis sanguin
16	Piroplasmose	Frottis sanguin	33	Ehrlichiose à E.canis et A. phagocytophilum	Sérologie
19	Hémangiosarcome	Cytologie liquide épanchement	38	Piroplasmose	Frottis sanguin
20	Histiocytose systémique	Cytologie prélèvement splénique	39	Leishmaniose	PCR, lecture myélogramme

VIDEMONT Emilie

INCIDENCE DES MALADIES BACTERIENNES A TRANSMISSION VECTORIELLE LORS D'ANEMIE IMMUNOLOGIQUE CHEZ LE CHIEN

Thèse Vétérinaire : Lyon, 4 septembre 2007

RESUME :

Les anémies immunologiques sont des anémies fréquentes chez le chien. Elles sont le plus souvent qualifiées de primaires ou « idiopathiques » dans la mesure où aucune cause sous-jacente n'est identifiée. Elles peuvent, cependant, se développer parallèlement à d'autres processus pathologiques, notamment des maladies bactériennes à transmission vectorielle telles que les rickettsioses, les ehrlichioses et les bartonelloses. Le but de ce travail est, dans un premier temps, de réaliser une synthèse de la bibliographie concernant l'origine et le diagnostic des anémies immunologiques chez le chien. Une étude expérimentale portant sur quarante cas d'anémie immunologique diagnostiqués à l'ENVL, au cours des années 2005 à 2007, est ensuite présentée. Elle a pour objectif d'évaluer l'incidence des maladies bactériennes précitées lors d'anémie immunologique chez le chien. La recherche est positive dans quatre cas, trois pour *Ehrlichia canis* et un pour *Ehrlichia canis* et *Anaplasma phagocytophilum*.

MOTS CLES :

- **Anémie immunologique**
- **Chien**
- **Maladies vectorielles**
- **Ehrlichiose**
- **Rickettsiose**
- **Bartonellose**

JURY :

Président :	Monsieur le Professeur ETIENNE
1er Assesseur :	Monsieur le Professeur CHABANNE
2ème Assesseur :	Monsieur le Professeur BOURDOISEAU
Membre invité :	Docteur PASTOR

DATE DE SOUTENANCE :

4 septembre 2007

ADRESSE DE L'AUTEUR :

28 clos cardinal – 54 210 VILLE EN VERMOIS