

CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année 2021 - Thèse n° 92

**MÉTHODES D'ANALYSE HÉMATOLOGIQUE CHEZ LES REPTILES :
APPROCHE APPLIQUÉE À LA TORTUE GRECQUE (*TESTUDO
GRAECA*) ET ÉVALUATION D'UN MODÈLE DE COMPTAGE ÉTABLI
AU SYSMEX XT2000I**

THESE

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 18 novembre 2021
Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

Par

KAMMERER Pauline

CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année 2021 - Thèse n° 92

MÉTHODES D'ANALYSE HÉMATOLOGIQUE CHEZ LES REPTILES : APPROCHE APPLIQUÉE À LA TORTUE GRECQUE (*TESTUDO GRAECA*) ET ÉVALUATION D'UN MODÈLE DE COMPTAGE ÉTABLI AU SYSMEX XT2000I

THESE

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 18 novembre 2021
Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

Par

KAMMERER Pauline

Liste des Enseignants du Campus Vétérinaire de Lyon (01-09-2021)

ABITBOL	Marie	DEPT - BASIC- SCIENCES	Professeur
ALVES- DE- OLIVEIRA	Laurent	DEPT - BASIC- SCIENCES	Maître de conférences
ARCANGIOLI	Marie- Anne	DEPT - ELEVAGE- SPV	Professeur
AYRAL	Florence	DEPT - ELEVAGE- SPV	Maître de conférences
BECKER	Claire	DEPT - ELEVAGE- SPV	Maître de conférences
BELLUCO	Sara	DEPT - AC- LOISIR- SPORT	Maître de conférences
BENAMOU- SMITH	Agnès	DEPT - AC- LOISIR- SPORT	Maître de conférences
BENOIT	Etienne	DEPT - BASIC- SCIENCES	Professeur
BERNY	Philippe	DEPT - BASIC- SCIENCES	Professeur
BONNET - GARIN	Jeanne- Marie	DEPT - BASIC- SCIENCES	Professeur
BOULOCHER	Caroline	DEPT - BASIC- SCIENCES	Maître de conférences
BOURDOISEAU	Gilles	DEPT - ELEVAGE- SPV	Professeur émérite
BOURGOIN	Gilles	DEPT - ELEVAGE- SPV	Maître de conférences
BRUYERE	Pierre	DEPT - BASIC- SCIENCES	Maître de conférences
BUFF	Samuel	DEPT - BASIC- SCIENCES	Professeur
BURONFOSSE	Thierry	DEPT - BASIC- SCIENCES	Professeur
CACHON	Thibaut	DEPT - AC- LOISIR- SPORT	Maître de conférences
CADORÉ	Jean-Luc	DEPT - AC- LOISIR- SPORT	Professeur
CALLAIT - CARDINAL	Marie- Pierre	DEPT - ELEVAGE- SPV	Maître de conférences
CHABANNE	Luc	DEPT - AC- LOISIR- SPORT	Professeur
CHALVET - MONFRAY	Karine	DEPT - BASIC- SCIENCES	Professeur
DE BOYER DES ROCHES	Alice	DEPT - ELEVAGE- SPV	Maître de conférences
DELIGNETTE- MULLER	Marie- Laure	DEPT - BASIC- SCIENCES	Professeur
DJELOUADJI	Zorée	DEPT - ELEVAGE- SPV	Maître de conférences
ESCRIOU	Catherine	DEPT - AC- LOISIR- SPORT	Maître de conférences
FRIKHA	Mohamed-Ridha	DEPT - ELEVAGE- SPV	Maître de conférences
GALIA	Wessam	DEPT - ELEVAGE- SPV	Maître de conférences
GILLOT - FROMONT	Emmanuelle	DEPT - ELEVAGE- SPV	Professeur
GONTHIER	Alain	DEPT - ELEVAGE- SPV	Maître de conférences
GRANCHER	Denis	DEPT - BASIC- SCIENCES	Maître de conférences
GREZEL	Delphine	DEPT - BASIC- SCIENCES	Maître de conférences
HUGONNARD	Marine	DEPT - AC- LOISIR- SPORT	Maître de conférences
JUNOT	Stéphane	DEPT - AC- LOISIR- SPORT	Professeur
KODJO	Angeli	DEPT - ELEVAGE- SPV	Professeur
KRAFFT	Emilie	DEPT - AC- LOISIR- SPORT	Maître de conférences
LAABERKI	Maria- Halima	DEPT - ELEVAGE- SPV	Maître de conférences
LAMBERT	Véronique	DEPT - BASIC- SCIENCES	Maître de conférences
LE GRAND	Dominique	DEPT - ELEVAGE- SPV	Professeur
LEBLOND	Agnès	DEPT - AC- LOISIR- SPORT	Professeur
LEDOUX	Dorothee	DEPT - ELEVAGE- SPV	Maître de conférences
LEFEBVRE	Sébastien	DEPT - BASIC- SCIENCES	Maître de conférences
LEFRANC - POHL	Anne-Cécile	DEPT - BASIC- SCIENCES	Maître de conférences
LEGROS	Vincent	DEPT - ELEVAGE- SPV	Maître de conférences
LEPAGE	Olivier	DEPT - AC- LOISIR- SPORT	Professeur
LOUZIER	Vanessa	DEPT - BASIC- SCIENCES	Professeur
MARCHAL	Thierry	DEPT - AC- LOISIR- SPORT	Maître de conférences
MOISSONNIER	Pierre	DEPT - AC- LOISIR- SPORT	Maître de conférences
MOSCA	Marion	DEPT - AC- LOISIR- SPORT	Maître de conférences
MOUNIER	Luc	DEPT - ELEVAGE- SPV	Professeur
PEPIN	Michel	DEPT - BASIC- SCIENCES	Professeur
PIN	Didier	DEPT - AC- LOISIR- SPORT	Professeur
PONCE	Frédérique	DEPT - AC- LOISIR- SPORT	Professeur
PORTIER	Karine	DEPT - AC- LOISIR- SPORT	Professeur
POUZOT - NEVORET	Céline	DEPT - AC- LOISIR- SPORT	Maître de conférences
PROUILLAC	Caroline	DEPT - BASIC- SCIENCES	Professeur
REMY	Denise	DEPT - AC- LOISIR- SPORT	Professeur
RENE MARTELLET	Magalie	DEPT - ELEVAGE- SPV	Maître de conférences
ROGER	Thierry	DEPT - BASIC- SCIENCES	Professeur
SAWAYA	Serge	DEPT - BASIC- SCIENCES	Maître de conférences
SCHRAMME	Michael	DEPT - AC- LOISIR- SPORT	Professeur
SERGENTET	Delphine	DEPT - ELEVAGE- SPV	Professeur
THIEBAULT	Jean- Jacques	DEPT - BASIC- SCIENCES	Maître de conférences
TORTEREAU	Antonin	DEPT - AC- LOISIR- SPORT	Maître de conférences
VIGUIER	Eric	DEPT - AC- LOISIR- SPORT	Professeur
ZENNER	Lionel	DEPT - ELEVAGE- SPV	Professeur

Remerciements

À Madame la Professeur Sophie COLLARDEAU-FRACHON
De l'Université Claude Bernard Lyon 1, Faculté de médecine Lyon Est,
Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse,
Mes hommages les plus respectueux.

À Madame la Professeur Ève RAMERY
De VetAgro Sup campus vétérinaire de Lyon,
Pour m'avoir fait l'honneur de prendre part à ce travail,
Pour vos recommandations et votre soutien,
Mes sincères remerciements.

À Monsieur le Professeur Thierry BURONFOSSE
De VetAgro Sup campus vétérinaire de Lyon,
Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter l'encadrement de ce travail,
Pour votre aide et vos conseils avisés,
Mes sincères remerciements.

À Madame la Professeur Magalie RENÉ-MARTELLET
De VetAgro Sup campus vétérinaire de Lyon,
Pour votre aide précieuse dans l'élaboration de ce travail, votre grande disponibilité et
votre bienveillance,
Mes sincères remerciements.

Table des matières

Tables des annexes	13
Table des figures	15
Table des tableaux.....	21
Liste des abréviations.....	23
Introduction.....	25
<u>PARTIE 1 : Présentation des tortues grecques (<i>Testudo graeca</i>) et examen clinique</u>	
<i>I. Classification des chéloniens et identification des tortues grecques au sein du genre <i>Testudo</i>.....</i>	
27	
A. Classification des tortues grecques	
27	
B. Identification des tortues de l'espèce <i>Testudo graeca</i>	
28	
1. Intérêts de l'identification des espèces de tortues	28
2. Caractéristiques de l'espèce <i>Testudo graeca</i> et diagnose avec l'espèce <i>Testudo hermanni</i>	28
3. Identification de quelques sous-espèces de <i>Testudo graeca</i>	29
4. Identification du sexe chez la tortue grecque	30
II. Distribution géographique et écologie	
31	
A. Distribution géographique	
31	
B. Mode de vie naturel.....	
31	
1. Habitat.....	31
2. Activité et hibernation.....	32
3. Alimentation	32
4. Reproduction.....	33
III. Conditions de captivité des tortues méditerranéennes	
33	
A. Déclaration et conditions de détention.....	
33	
B. Milieu de vie.....	
33	
1. Vie en milieu extérieur.....	34
2. Vie en milieu intérieur	35
C. Présence de congénères	
36	
D. Alimentation	
36	
E. Hibernation.....	
37	
IV. Examen clinique général et particularités anatomiques des chéloniens	
38	
A. Anamnèse et commémoratifs.....	
38	
B. Observation à distance	
38	
C. État corporel et mesures du poids et de la taille	
39	
D. Examen rapproché.....	
39	
1. Examen de la tête et des structures associées.....	39
2. Examen de la peau et de la carapace	40
3. Examen des membres.....	41
4. Examen du coelome.....	41
5. Examen du cloaque	41
6. Examen des matières fécales et urinaires	41
7. Auscultation cardiaque et respiratoire.....	41

PARTIE 2 : Analyse hématologique chez les reptiles et plus particulièrement chez la tortue grecque

I. Les cellules sanguines : rôles et caractéristiques chez les reptiles	43
A. Hématopoïèse et vie des cellules sanguines	43
1. La lignée rouge	43
2. La lignée blanche	45
3. La thrombopoïèse.....	46
B. Rôle des cellules sanguines	47
1. Érythrocytes	47
2. Leucocytes	47
3. Thrombocytes	49
C. Morphologie et dimensions des cellules	50
1. Chez les reptiles	50
2. Caractéristiques morphologiques des cellules sanguines chez la tortue grecque	60
II. La numération formule sanguine chez la tortue terrestre	70
A. Paramètres hématologiques quantitatifs	70
1. Lignée rouge	70
2. Lignée blanche et WBC	71
3. Thrombocytes et TTC	71
B. Prélèvement sanguin chez la tortue terrestre.....	71
1. Volume sanguin collecté.....	71
2. Matériel et choix de l'anticoagulant.....	72
3. Contention et site de prélèvement	74
4. Évaluation de la qualité du prélèvement	86
5. Stockage et conservation du prélèvement	86
C. Méthodes d'analyse chez les reptiles.....	87
1. Automate.....	87
2. Technique de centrifugation par microhématocrite.....	88
3. Méthode de cyanméthémoglobine	89
4. Hémocytomètre et comptage cellulaire	90
5. Frottis et évaluation qualitative des cellules.....	96

PARTIE 3 : Valeurs hématologiques de référence et anomalies de l'hémogramme chez les reptiles et plus particulièrement chez la tortue grecque

I. Valeurs hématologiques de référence chez la tortue grecque et variations physiologiques	125
A. Intérêts et limites des analyses hématologiques chez les reptiles	125
B. Variations physiologiques des valeurs hématologiques.....	126
1. Variations intrinsèques.....	126
2. Variations extrinsèques	128
C. Variations selon le site de prélèvement et la méthode d'analyse	132
1. Site de prélèvement	132
2. Méthode d'analyse	132
D. Valeurs connues chez la tortue grecque.....	133

II. Principales anomalies quantitatives de l'hémogramme et modifications cellulaires associées..... 136

A. Lignée rouge	136
1. Anémie.....	136
2. Polycythémie ou polyglobulie.....	142
B. Lignée blanche	143
1. Hétérophile.....	144
2. Éosinophile	145
3. Basophile.....	145
4. Lymphocyte	146
5. Monocyte	147
C. Thrombocyte.....	148

PARTIE 4: Etude préliminaire de l'intérêt de l'automate Sysmex dans l'élaboration d'une numération formule sanguine chez la tortue grecque

I. Matériels et méthodes..... 149

A. Animaux	149
B. Prélèvements sanguins	150
C. Transport et délai d'analyses	150
D. Analyses et objectifs	150
1. Méthode de Natt et Herrick.....	151
2. Méthode d'estimation par frottis	152
3. Comptage automatisé par le Sysmex	153
4. Mesure du PCV par microhématocrite.....	156

II. Résultats..... 157

A. Comparaison entre le comptage érythrocytaire (RBC) obtenu par la méthode de Natt et Herrick et par l'automate Sysmex.....	157
B. Comparaison entre le comptage leucocytaire (WBC) obtenu par la méthode de Natt et Herrick et par l'automate Sysmex.....	158
C. Comparaison entre le comptage leucocytaire (WBC) obtenu par la méthode de Natt et Herrick et par frottis sanguin.....	159
D. Comparaison du comptage plaquettaire (TTC) obtenu par frottis sanguin et par l'automate.....	160
E. Comparaison du différentiel leucocytaire obtenu par frottis sanguin et par l'automate Sysmex	161
F. Établissement du PCV mesuré par microhématocrite et de la concentration en hémoglobine mesurée par l'automate Sysmex	162

III. Discussion..... 163

A. Comparaison du RBC obtenu par la méthode de Natt et Herrick et par l'automate Sysmex	163
B. Comparaison des méthodes pour l'établissement du WBC	163
1. Comparaison du WBC obtenu par la méthode de Natt et Herrick et par l'automate Sysmex	163
2. Comparaison du WBC obtenu par la méthode de Natt et Herrick et par frottis sanguin.....	165
C. Comparaison du TTC obtenu par frottis sanguin et par l'automate.....	165

D. Comparaison du différentiel leucocytaire obtenu par frottis sanguin et par l'automate Sysmex	166
E. Comparaison des résultats obtenus dans cette étude préliminaire avec les normes bibliographiques	167
F. Limites et amélioration du modèle établi dans cette étude préliminaire	169
1. Mesures par impédance.....	169
2. Mesures par cytométrie en flux.....	169
Conclusion	173
Bibliographie.....	175
Annexes.....	185

Tables des annexes

Annexe 1 : dimensions et tailles moyennes des érythrocytes obtenues dans l'étude de Uğurtaş et al. chez des tortues grecques	185
Annexe 2 : dimensions et tailles moyennes des cellules sanguines obtenues dans l'étude de Tosunoglu et al. chez des tortues grecques	185
Annexe 3 : dimensions et tailles moyennes des cellules sanguines obtenues dans l'étude de Kassab et al. chez des tortues grecques	186
Annexe 4 : dimensions et tailles moyennes des cellules sanguines obtenues dans l'étude de Arikan et al. chez des tortues grecques	188
Annexe 5 : résultats obtenus dans l'étude de Lawrence et al	188
Annexe 6 : paramètres hématologiques obtenus dans l'étude de Tosunoglu et al. chez des tortues grecques	189
Annexe 7 : PCV obtenu dans l'étude de Mathes et al. chez des tortues grecques	190
Annexe 8 : paramètres hématologiques obtenus dans l'étude de El-Mansoury et al. en fonction du sexe chez des tortues grecques	190
Annexe 9 : paramètres hématologiques obtenus dans l'étude de Ali et al. en fonction du sexe chez des tortues grecques	190

Table des figures

Figure 1 : principaux critères de diagnose entre les tortues d'Hermann et grecques	29
Figure 2 : sous-espèces de <i>Testudo graeca</i> retrouvées fréquemment en captivité en France ..	30
Figure 3 : dimorphisme sexuel lié à la queue et à la partie supracaudale de la dossière chez la tortue grecque	31
Figure 4 : aires de répartition des sous-espèces de <i>Testudo graeca</i>	31
Figure 5 : habitat typique des tortues grecques à la réserve Cumbres de la Galera en Espagne à gauche, et au parc National des Monts Măcin en Roumanie à droite	32
Figure 6 : exemple d'enclos extérieur adapté aux tortues méditerranéennes	34
Figure 7 : à gauche, érythrocyte binucléé dans le sang circulant d'une tortue d'Hermann (<i>Testudo hermanni</i>) – coloration rapide Hemacolor. A droite, polychromatophile en mitose chez une tortue anémiée (espèce non précisée) – coloration de Wright-Giemsa.....	43
Figure 8 : différents stades de maturation d'un érythrocyte observés sur ponction de moelle osseuse.....	44
Figure 9 : différents stades de maturation d'un granulocyte hétérophile observés sur ponction de moelle osseuse d'un iguane vert (<i>Iguana iguana</i>) - coloration de Wright-Giemsa	46
Figure 10 : mécanisme d'hémostase	49
Figure 11 : érythrocytes d'aspect normal. A gauche, érythrocytes de <i>Pogona vitticeps</i> – coloration Diff-Quick. A droite, érythrocytes de <i>Testudo hermanni boettgeri</i> - Coloration rapide Hemacolor	51
Figure 12 : érythrocytes contenant des inclusions cytoplasmiques basophiles irrégulières considérées comme des artéfacts chez une tortue verte (<i>Chelonia mydas</i>) - Coloration de Wright-Giemsa	51
Figure 13 : érythrocyte polychromatophile parmi des érythrocytes chez une tortue boîte (<i>Terrapene carolina triunguis</i>) – Coloration de Wright-Giemsa	52
Figure 14 : à gauche, hétérophile sur un frottis sanguin d'iguane vert (<i>Iguana iguana</i>) - coloration de Wright-Giemsa. A droite, hétérophile sur un frottis sanguin d'un python birman (<i>Python molurus bivittatus</i>).- coloration de Wright	53
Figure 15 : éosinophile sur un frottis sanguin d'une tortue gaufree (<i>Gopherus agassizii</i>) à gauche et d'un iguane vert (<i>Iguana iguana</i>) à droite.- Coloration de Wright-Giemsa	54
Figure 16 : à gauche, basophile chez un iguane vert (<i>Iguana iguana</i>).- coloration de Wright-Giemsa. A droite, basophile chez une tortue grecque (<i>Testudo graeca</i>) – coloration de May-Grünwald Giemsa.....	55
Figure 17 : granules libres d'un basophile rompu chez un varan des savanes (<i>Varanus exanthematicus</i>) – Coloration de Wright-Giemsa modifiée.....	55
Figure 18 : à gauche, lymphocyte chez un varan du Pacifique (<i>Varanus indicus</i>), et à droite lymphocyte réactif chez un iguane vert (<i>Iguana iguana</i>) - Coloration de Wright-Giemsa	56
Figure 19 : à gauche, monocyte chez un iguane vert (<i>Iguana iguana</i>). Au milieu, monocyte chez une tortue (<i>Terrapene carolina triunguis</i>). A droite, monocytes chez un serpent (<i>Boa constrictor</i>) – Coloration de Wright-Giemsa.....	57
Figure 20 : à gauche, thrombocytes chez un iguane vert (<i>Iguana iguana</i>). A droite, agrégat de thrombocytes chez une tortue (<i>Terrapene carolina triunguis</i>) – Coloration de Wright-Giemsa	58
Figure 21 : thrombocyte parmi les érythrocytes chez une tortue des steppes (<i>Testudo horsfieldi</i>)	58
Figure 22 : lymphocyte (flèche) et thrombocyte chez un serpent (<i>Boa constrictor</i>) – coloration de Wright-Giemsa	58
Figure 23 : érythrocytes à gauche et au milieu, et érythrocytes contenant des vacuoles chez une tortue grecque à droite – coloration de Wright.....	63

Figure 24 : hétérophile chez une tortue grecque – coloration de Wright à gauche et coloration de May-Grünwald Giemsa à droite	64
Figure 25 : éosinophiles chez une tortue grecque – coloration de Wright à gauche et au milieu, coloration de May-Grünwald Giemsa à droite	65
Figure 26 : basophiles chez une tortue grecque – coloration de Wright à gauche et coloration de May-Grünwald Giemsa à droite	65
Figure 27 : lymphocytes chez une tortue grecque – coloration de Wright à gauche et au milieu et coloration de May-Grünwald Giemsa à droite	66
Figure 28 : monocytes chez une tortue grecque – coloration de Wright à gauche et coloration de May-Grünwald Giemsa à droite	67
Figure 29 : thrombocytes chez une tortue grecque– coloration de Wright à gauche et coloration de May-Grünwald Giemsa au milieu et à droite	68
Figure 30 : frottis sanguin de python (<i>Python molurus bivittatus</i>) réalisé à partir de sang collecté dans un tube hépariné	72
Figure 31 : anatomie de la région cervicale chez une tortue d’Hermann (<i>Testudo hermanni</i>)	75
Figure 32 : technique de prélèvement sanguin au niveau de la veine jugulaire chez une tortue grecque	76
Figure 33 : localisation du sinus sub-carapacial chez la tortue	77
Figure 34 : technique de prélèvement sanguin au sinus sub-carapacial chez une tortue (<i>Pyxis</i> sp)	77
Figure 35 : localisation de la veine dorsale caudale sur coupe transversale de queue de tortue	78
Figure 36 : technique de prélèvement sanguin à la veine caudale dorsale chez une tortue (espèce non précisée)	79
Figure 37: technique de prélèvement sanguin à la veine caudale ventrale chez une tortue (espèce non précisée)	79
Figure 38 : technique de prélèvement sanguin au plexus veineux post-occipital chez une tortue.....	80
Figure 39 : anatomie du plexus veineux de la région caudale du membre antérieur chez une tortue d’Hermann (<i>Testudo hermanni</i>).....	81
Figure 40 : technique de prélèvement sanguin au niveau de la veine brachiale chez une tortue d’Hermann (<i>Testudo hermanni</i>)	81
Figure 41 : technique de cardiocentèse chez une tortue juvénile (espèce non précisée).....	83
Figure 42 : à gauche, anatomie de la veine fémorale en région caudale du membre postérieur et à droite, technique de prélèvement sanguin au niveau de la veine fémorale chez une tortue d’Hermann (<i>Testudo hermanni</i>)	84
Figure 43 : aspect d’un tube à microhématocrite après centrifugation	88
Figure 44 : principe de lecture du PCV sur une carte de lecture linéaire à gauche et sur un dispositif circulaire à droite.....	88
Figure 45 : exemple d’hémoglobinomètre, l’analyseur HemoCue Hb 201+, utilisé pour la mesure de la concentration en hémoglobine	90
Figure 46 : à droite, remplissage d’une chambre de lecture au sein d’un hémocytomètre de Neubauer et à gauche, grille microscopique d’une chambre de lecture d’un hémocytomètre de Neubauer	91
Figure 47 : cellule de comptage Kova à gauche et hémocytomètre jetable à quatre chambres à droite.....	91
Figure 48 : méthode d’inclusion des cellules au sein d’un grand carré de l’hémocytomètre ..	91
Figure 49 : aspect des leucocytes et des érythrocytes dans un hémocytomètre de Neubauer..	93
Figure 50 : aspect des érythrocytes et des thrombocytes au sein d’une cellule de comptage Kova	93

Figure 51 : de gauche à droite, méthode coverslip-to-slide technique, bevel-edge slide technique et slide-to-slide technique	98
Figure 52 : technique de glissement biseauté par la méthode « en poussant »	98
Figure 53 : zone adéquate pour l'observation des cellules sur un frottis sanguin.....	100
Figure 54 : érythrocyte anucléé chez une vipère amodytes (<i>Vipera ammodytes</i>) – coloration rapide Hemacolor	104
Figure 55 : poikilocytose chez un caméléon casqué du Yémen (<i>Chamaeleo calypttratus</i>) – coloration rapide Hemacolor	104
Figure 56 : érythrocyte ancien chez une tortue grecque - coloration rapide Hemacolor	105
Figure 57 : érythrocyte immature (flèche) et érythrocyte polychromatophile (pointe de flèche) dans le frottis sanguin d'une tortue Émyde peinte de Bornéo (<i>Batagur borneoensis</i>) – coloration de Wright-Giemsa	105
Figure 58 : érythrocyte binucléé chez une tortue émyde à cou rayé commune (<i>Chinemys reevesii</i>), coloration de Wright-Giemsa	106
Figure 59 : inclusions basophiles irrégulières dans le cytoplasme des érythrocytes chez une tortue verte (<i>Chelonia mydas</i>) - coloration de Wright-Giemsa.....	108
Figure 60 : vacuoles cytoplasmiques d'origine artéfactuelle chez un iguane vert (<i>Iguana Iguana</i>) – coloration rapide Diff-Quick.....	108
Figure 61 : vacuoles intra-érythrocytaires chez une tortue de Kemp (<i>Lepidochelys kempii</i>)	109
Figure 62 : inclusion cytoplasmique bleutée due à l'IBD au sein d'un érythrocyte chez un python réticulé (<i>Malayopython reticulatus</i>) – coloration de Wright-Giemsa modifiée	109
Figure 63 : érythrocyte contenant des inclusions causées par un Iridovirus chez un serpent terciopelo (<i>Bothrops asper</i>) – coloration de Wright-Giemsa	110
Figure 64 : changements morphologiques au sein d'hétérophiles toxiques chez des reptiles	115
Figure 65 : hétérophile immature toxique chez une tortue grecque	116
Figure 66 : éosinophile normal (flèche fine) et éosinophile immature contenant des granules éosinophiles et basophiles (flèche large) chez une tortue-boîte (<i>Cuora galbinifrons</i>) – coloration de Wright-Giemsa	116
Figure 67 : lymphocyte réactif chez un iguane vert (<i>Iguana iguana</i>) - Coloration de Wright-Giemsa.....	117
Figure 68 : lymphoblaste chez un iguane vert (<i>Iguana iguana</i>) – coloration de Wright-Giemsa	117
Figure 69 : monocyte activé chez une tortue sillonnée (<i>Geochelone sulcata</i>)	118
Figure 70 : monocyte en cours d'érythrophagocytose chez un iguane vert (<i>Iguana iguana</i>) – coloration de Wright-Giemsa	118
Figure 71 : mélanomacrophage chez un iguane vert (<i>Iguana iguana</i>) – coloration de Wright-Giemsa.....	118
Figure 72 : vacuole contenant probablement des lipides au sein d'un monocyte de boa constrictor (<i>Boa constrictor</i>) – coloration de Wright-Giemsa.....	119
Figure 73 : granules de mélanine au sein d'un monocyte chez une tortue géante des Seychelles (<i>Dipsochelys dussumieri</i>)– coloration de Wright-Giemsa.....	119
Figure 74 : inclusions homogènes basophiles d'IBD déplaçant le noyau des lymphocytes chez un boa constrictor commun (<i>Boa constrictor imperator</i>) – coloration de Wright-Giemsa...	120
Figure 75 : monocyte contenant une inclusion causée par un Poxvirus (flèche en pointillés) et une causée par Chlamydia (flèche pleine) chez un caméléon bilobé – coloration de Wright-Giemsa.....	120

Figure 76 : inclusions rondes, roses et granulaires causées par un iridovirus au sein de leucocytes chez une tortue-boîte (<i>Terrapene carolina carolina</i>) – coloration de Wright-Giemsa	120
Figure 77 : bactérie phagocytée par un hétérophile toxique au sein d'un frottis sanguin d'alligator américain (<i>Alligator mississippiensis</i>) – coloration de Wright-Giemsa.....	121
Figure 78 : inclusion causée par la bactérie <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> au sein d'un monocyte chez un boa émeraude (<i>Corallus caninus</i>) – coloration de Wright-Giemsa	121
Figure 79 : monocyte infecté par une hémogrégarine chez un lézard arc-en-ciel (<i>Ameiva ameiva</i>) – coloration non précisée.....	122
Figure 80 : thrombocytes activés chez une tortue gaufree (<i>Gopherus polyphemus</i>)	122
Figure 81 : thrombocyte contenant des inclusions d'IBD chez un boa de la Jamaïque (<i>Epicrates subflavus</i>) – coloration de Wright-Giemsa	123
Figure 82 : variations saisonnières des paramètres de la lignée rouge chez des tortues grecques	129
Figure 83 : variations saisonnières du WBC et de la concentration en leucocytes chez des tortues grecques.....	130
Figure 84 : hémorragie traumatique chez une tortue de Patagonie (<i>Chelonoidis chilensis</i>)..	137
Figure 85 : tiques (<i>Amblyoma argentina</i>) présentes sur les membres postérieurs et la queue d'une tortue de Patagonie (<i>Chelonoidis chilensis</i>).....	137
Figure 86 : érythrocyte polychromatique chez une tortue-boîte (<i>Terrapene carolina triunguis</i>) - Coloration de Wright-Giemsa	141
Figure 87 : anisocytose et érythrocyte binucléé en faveur d'un mécanisme régénératif chez une tortue d'Hermann anémiée (<i>Testudo hermanni</i>) – coloration rapide Hemacolor.....	142
Figure 88 : hétérophiles toxiques chez un iguane vert (<i>Iguana iguana</i>).....	144
Figure 89 : lymphocyte réactif au sein d'un frottis sanguin de tortue sillonnée (<i>Centrochelys sulcata</i>) – coloration de Wright-Giemsa.....	147
Figure 90 : lame Kova et ses 10 puits de comptage à droite et schéma d'un puits à gauche .	151
Figure 91 : zone de comptage des leucocytes et des thrombocytes à gauche, zone de comptage des érythrocytes à droite.....	152
Figure 92 : graphiques 4DIFF et GB/BASO générés par l'automate Sysmex à partir de sang humain.....	154
Figure 93 : essai de modèle à gauche et modèle sélectionné pour l'étude à droite chez la même tortue.....	155
Figure 94 : modèle sélectionné pour l'étude et identification des populations cellulaires au sein du scattergramme	155
Figure 95 : comparaison du RBC obtenu par l'automate et la méthode de référence. Test de comparaison de Wilcoxon sur échantillons appariés à gauche et représentation de Deming de la corrélation entre les deux variables à droite	157
Figure 96 : comparaison du WBC obtenu par l'automate et la méthode de référence. Test de comparaison de Wilcoxon sur échantillons appariés à gauche et représentation de Deming de la corrélation entre les deux variables à droite	158
Figure 97 : variation de la répartition des nuages de points au sein du scattergramme selon les individus (tortue n°1 à droite et tortue n°2 à gauche)	158
Figure 98 : comparaison du WBC obtenu par les méthodes de Natt-Herrick et par frottis. Test de comparaison de Wilcoxon sur échantillons appariés à gauche et représentation de Deming de la corrélation entre les deux variables à droite	159
Figure 99 : plaquettes à gauche et lymphocyte à droite observés au frottis sanguin d'une tortue grecque – coloration de May-Grünwald Giemsa	159
Figure 100 : exemple de graphique d'impédance généré pour les thrombocytes avec le modèle sélectionné.....	160

Figure 101 : comparaison du TTC obtenu par les méthodes de Natt-Herrick, par l'automate et par frottis. Test de comparaison de Wilcoxon sur échantillons appariés à gauche et représentation de Deming de la corrélation entre les deux variables à droite 160

Figure 102 : comparaison du différentiel leucocytaire obtenu par frottis, par le modèle d'automate sélectionné (méthode 3) et par deux autres modèles (méthodes 1 et 2) 161

Table des tableaux

Tableau I : classification de la tortue grecque <i>Testudo graeca</i>	27
Tableau II : principaux critères de diagnose entre les tortues d'Hermann et les tortues grecques	28
Tableau III : récapitulatif des principales caractéristiques des cellules sanguines chez les reptiles	59
Tableau IV : récapitulatif des études s'intéressant à la morphologie des cellules sanguines et leurs dimensions chez la tortue grecque.....	61
Tableau V : récapitulatif des dimensions cellulaires et de la taille des érythrocytes d'après quatre études menées chez la tortue grecque.....	63
Tableau VI : récapitulatif des dimensions cellulaires et de la taille des hétérophiles d'après deux études menées chez la tortue grecque.....	64
Tableau VII : récapitulatif des dimensions cellulaires et de la taille des éosinophiles d'après trois études menées chez la tortue grecque	65
Tableau VIII : récapitulatif des dimensions cellulaires et de la taille des basophiles d'après trois études menées chez la tortue grecque	66
Tableau IX : récapitulatif des dimensions cellulaires et de la taille des lymphocytes d'après trois études menées chez la tortue grecque	67
Tableau X : récapitulatif des dimensions cellulaires et de la taille des monocytes d'après trois études menées chez la tortue grecque	67
Tableau XI : récapitulatif des dimensions cellulaires et de la taille des thrombocytes d'après trois études menées chez la tortue grecque	68
Tableau XII : synthèse de quelques études menées chez les reptiles et évaluant l'impact des anticoagulants sur la qualité des analyses sanguines	73
Tableau XIII : avantages et inconvénients du prélèvement sanguin à la veine jugulaire	76
Tableau XIV : avantages et inconvénients du prélèvement sanguin au sinus sub-carapacial..	78
Tableau XV : avantages et inconvénients du prélèvement sanguin aux veines caudales dorsale et ventrale	80
Tableau XVI : avantages et inconvénients du prélèvement sanguin au sinus veineux occipital	81
Tableau XVII : avantages et inconvénients du prélèvement sanguin à la veine brachiale	82
Tableau XVIII : avantages et inconvénients du prélèvement sanguin au niveau du cœur.....	83
Tableau XIX : synthèse de quelques études réalisées chez la tortue et évaluant l'impact du site de prélèvement sanguin sur la lymphodilution	85
Tableau XX : comparaison des méthodes directe et semi-directe pour le dénombrement des leucocytes	95
Tableau XXI : principales anomalies rencontrées lors de la réalisation d'un frottis sanguin et causes possibles.....	99
Tableau XXII : principales altérations morphologiques des érythrocytes	107
Tableau XXIII : récapitulatif des principaux hémoparasites à l'origine d'inclusions érythrocytaires chez les reptiles	112
Tableau XXIV : récapitulatif des paramètres sanguins, leurs unités dans le système international et leurs méthodes de mesure	124
Tableau XXV : principaux facteurs extrinsèques et intrinsèques affectant l'hémogramme chez les reptiles.....	131
Tableau XXVI : récapitulatif des études hématologiques menées chez la tortue grecque.....	134
Tableau XXVII : récapitulatif des principales causes d'anémie chez les reptiles.....	139
Tableau XXVIII : récapitulatif des principales causes de polyglobulie chez les reptiles	143

Tableau XXIX : récapitulatif des principales causes d'hétérophilie et d'hétéropénie chez les reptiles	145
Tableau XXX : récapitulatif des principales causes d'éosinophilie et d'éosinopénie chez les reptiles	145
Tableau XXXI : récapitulatif des principales causes de basophilie et de basopénie chez les reptiles	146
Tableau XXXII : récapitulatif des principales causes de lymphocytose et de lymphopénie chez les reptiles.....	147
Tableau XXXIII : récapitulatif des principales causes de monocytose chez les reptiles	148
Tableau XXXIV : récapitulatif des principales causes de thrombocytopénie chez les reptiles	148
Tableau XXXV : critères d'inclusion des individus de l'étude	149
Tableau XXXVI: caractéristiques des individus inclus dans l'étude.....	150
Tableau XXXVII : mesure du PCV et de la concentration en hémoglobine	162
Tableau XXXVIII : comparaison du WBC moyen obtenu dans notre étude préliminaire et dans les références bibliographiques.....	168
Tableau XXXIX : comparaison du RBC moyen obtenu dans notre étude préliminaire et dans les références bibliographiques	168
Tableau XL : comparaison du PCV moyen obtenu dans notre étude préliminaire et dans les références bibliographiques.....	168

Liste des abréviations

ASVCP : American Society for Veterinary Clinical Pathology
CIVD : Coagulation Intravasculaire Disséminée
EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique
Hb : concentration en hémoglobine
Ht : microhématocrite
IBD : Inclusion Body Disease (maladie des corps d'inclusion)
MCH : Mean Corpuscular Hemoglobin (Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine TCMH)
MCHC : Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (Concentration Globulaire Moyenne en Hémoglobine CGMH)
MCV : Mean Cell Volume (Volume Globulaire Moyen VGM)
MGG : May-Grünwald Giemsa
PAS : Periodic Acid Schiff
PCR : Polymerase Chain Reaction
PCV : Packed Cell Volume
Rapport N/C : rapport nucléocytoplasmique
RBC : Red Blood Cell
SD : Standard Deviation (écart type)
TTC : Total Trombocyte Count
UICN : Union Internationale pour la Conservation de la Nature
UV B : rayonnement ultraviolet
VPP : Valeur Prédictive Positive
WBC : White Blood Cell

Introduction

Les tortues grecques appartiennent aux Nouveaux Animaux de Compagnie et sont très fréquemment retrouvées dans les jardins de particuliers. Bien que non présente à l'état sauvage en France, cette espèce a été largement importée et fait aujourd'hui partie des espèces les plus fréquemment retrouvées en consultation vétérinaire. Chez les reptiles, de nombreuses pathologies sont causées par des conditions de détention inadaptées en termes d'environnement mais également d'alimentation. Il est donc primordial de connaître leurs besoins spécifiques.

De par leur anatomie, l'examen clinique, bien que primordial, est assez limité chez les chéloniens ce qui complique la démarche diagnostique chez ces espèces. Le recours à des examens complémentaires tels que l'imagerie et les analyses sanguines biochimiques et hématologiques est souvent nécessaire à l'établissement d'un diagnostic. Les indications d'évaluation hématologique chez les reptiles sont nombreuses et similaires à celles des mammifères de compagnie. Classiquement, l'hématologie est utilisée pour détecter des pathologies affectant les cellules sanguines telles que les maladies inflammatoires, les parasitémies, les anémies ou encore les troubles hématopoïétiques. Bien menée, il s'agit donc d'une aide précieuse pour le clinicien. Elle constitue également l'un des outils diagnostiques les plus couramment utilisés en médecine vétérinaire en raison de sa facilité d'exécution et de sa large disponibilité au sein des structures vétérinaires. Alors que l'hématologie des mammifères est largement réalisée à l'aide de compteurs cellulaires automatisés, les analyses hématologiques reptiliennes nécessitent des méthodes manuelles en raison de leurs érythrocytes et thrombocytes nucléés. Ces méthodes d'analyses sont techniques et chronophages ce qui limite leur réalisation.

L'interprétation d'un hémogramme est d'autant plus complexe que les valeurs hématologiques physiologiques des reptiles varient considérablement par rapport à celles des mammifères domestiques : les conditions environnementales, l'état physiologique, l'âge, ou encore le sexe influent sur l'hémogramme normal des reptiles. Les valeurs de référence hématologiques publiées pour les reptiles ne prennent que rarement ou partiellement en compte ces paramètres ce qui complique, là encore, leur interprétation.

En conséquence et bien que la médecine des Nouveaux Animaux de Compagnie se soit considérablement développée au cours des dernières décennies, les analyses hématologiques sont rarement mises en œuvre par les vétérinaires praticiens chez la tortue. Cette étude a donc pour but de présenter les méthodes d'analyses hématologiques chez les reptiles et notamment chez la tortue grecque ainsi que les spécificités permettant d'interpréter correctement un hémogramme. Dans un deuxième temps, l'étude préliminaire présentée ci-après a pour but d'évaluer l'intérêt de l'automate Sysmex XT-2000i dans l'élaboration d'un hémogramme après réglage manuel chez la tortue grecque. Pour cela, les méthodes de référence de comptage cellulaire ont été comparées au Sysmex pour l'établissement d'une numération formule sanguine.

PARTIE 1 : PRÉSENTATION DES TORTUES GRECQUES ET EXAMEN CLINIQUE

I. Classification des chéloniens et identification des tortues grecques au sein du genre *Testudo*

A. Classification des tortues grecques

La classification des reptiles est en constante évolution. Nous présenterons ici les données actuelles recensées par l'UICN, l'Union internationale pour la conservation de la nature.

Les tortues appartiennent à l'embranchement Chordata, au sous-embranchement Vertebrata et à la classe Reptilia. La classe des reptiles est-elle même divisée en plusieurs ordres : les Testudines, les Rhynchocephalia, les Squamata (regroupant les lézards et les serpents) et les Crocodylia (Cheylan *et al.*, 2004).

L'ordre des Testudines, aussi appelé Chéloniens, englobe actuellement 14 familles et 97 genres soit plus de 327 espèces de tortues terrestres, marines ou d'eau douce. Cet ordre est divisé en deux sous-ordres : les Cryptodira et les Pleurodira. Les tortues cryptodiranes peuvent rétracter leur tête et leur cou directement au sein de leur carapace tandis que les pleurodiranes doivent plier leur cou latéralement. Bien que les tortues marines soient incapables de rétracter leur cou au sein de leur carapace, celles-ci font tout de même partie des Cryptodira (Divers and Stahl, 2018).

Les tortues grecques appartiennent au sous-ordre des Cryptodira. Ce dernier est composé de 11 familles et 74 genres ce qui regroupe plus de 250 espèces de tortues. Les tortues grecques appartiennent à la superfamille des Testudinoidea et à la famille des Testudinidae. Cette famille contient le genre *Testudo* auquel appartient, avec quatre autres espèces (*T. hermanni*, *T. horsfieldii*, *T. kleinmanni* et *T. marginata*), la tortue grecque *Testudo graeca*. Les espèces et les sous-espèces appartenant au genre *Testudo* font l'objet de nombreux débats parmi les taxonomistes. En conséquence, les différents auteurs ne s'accordent pas toujours sur la classification des espèces de ce genre, d'autant plus qu'elle est en constante évolution (Chitty and Raftery, 2013).

La classification détaillée de la tortue grecque est détaillée ci-dessous ([Tableau I](#)).

Tableau I : classification de la tortue grecque *Testudo graeca* (Cheylan *et al.*, 2004)

Classification de la tortue grecque <i>Testudo graeca</i>	
Règne	Animalia
Embranchement	Chordata
Sous-embranchement	Vertebrata
Clade	Amniota
Classe	Reptilia
Ordre	Testudines
Sous-ordre	Cryptodira
Famille	Testudinidae
Genre	<i>Testudo</i>

B. Identification des tortues de l'espèce *Testudo graeca*

1. Intérêts de l'identification des espèces de tortues

Il est primordial d'identifier les espèces de tortues présentées en consultation afin de conseiller les propriétaires et de répondre au mieux aux besoins naturels des animaux. Comme nous le verrons dans la partie 3 I.B.1.a) concernant les normes hématologiques et leurs variations, les valeurs physiologiques hématologiques varient selon l'espèce de tortue. La reconnaissance des espèces les plus courantes est donc indispensable lors de l'interprétation de l'hémogramme.

Une identification précise des individus peut être particulièrement difficile chez les juvéniles car de nombreuses caractéristiques d'espèces se développent avec l'âge. Les anomalies de croissance et les altérations de la forme de la carapace peuvent également compliquer la diagnose (Pellett and Cope, 2013).

2. Caractéristiques de l'espèce *Testudo graeca* et diagnose avec l'espèce *Testudo hermanni*

La tortue grecque, aussi appelée communément tortue mauresque est de taille moyenne. En effet, elle mesure environ 30 cm pour un poids n'excédant pas les 3 kg à l'âge adulte (Andreu *et al.*, 2004). Sa dossière est bombée et la coloration de cette dernière est assez variable : le plus souvent elle est de couleur vert foncé à brun mais une dossière de couleur jaunâtre à olivâtre est également possible. Des motifs foncés sont observables sur les écailles. Le plastron, quant à lui, est clair et recouvert de taches irrégulières et foncées. La tête de la tortue grecque est tachetée de noir plus ou moins de jaune. Enfin, les membres antérieurs sont recouverts de larges écailles et possèdent cinq griffes (Chitty and Raftery, 2013)(Andreu *et al.*, 2004).

Les tortues grecques sont à différencier des tortues d'Hermann (*Testudo hermanni*) elles-aussi fréquemment retrouvées en captivité en France. Les critères de différenciation entre ces deux espèces sont détaillés ci-dessous ([Tableau II](#))([Figure 1](#)).

Tableau II : principaux critères de diagnose entre les tortues d'Hermann et les tortues grecques (Schilliger, 2007)

	Tortues d'Hermann	Tortues grecques au sens large
Écaille supra-caudale	Divisée en deux	Non divisée
Ergots situés faces postérieures des cuisses	Absents	Présents
Griffe kératinisée à l'extrémité de la queue	Présente	Absente
Dossière	Plus aplatie que <i>T.graeca</i>	Plus bombée que <i>T.hermannii</i>
Bandes noires sur le plastron	Bien dessinées, continues ou non	Tâches irrégulières
Écailles vertébrales	Étroites	Larges
Couleur tête	Sombre unie ou avec une tâche jaune en arrière de l'œil	Sombre unie ou tachetée jaune pâle sur le front



Figure 1 : principaux critères de diagnose entre les tortues d'Hermann et grecques (Schilliger, 2007)

3. Identification de quelques sous-espèces de *Testudo graeca*

Dix-huit sous-espèces de *Testudo graeca* ont été décrites et occupent diverses niches écologiques mais là encore, leur classification est largement discutée (Pellett and Cope, 2013)(Schilliger, 2007). La différenciation des sous-espèces au sein des tortues mauresques est relativement difficile et les études s'intéressant à l'hématologie des tortues grecques ne font que très rarement une distinction entre elles. Cependant, il est primordial de savoir reconnaître une tortue grecque lorsque celle-ci est présentée en consultation. Ci-dessous, nous présenterons donc brièvement quatre sous-espèces de *Testudo graeca* fréquemment retrouvées en captivité en France, qu'elles soient issues d'importation illégale ou non à savoir *T. graeca graeca*, *T. graeca iberica*, *T. graeca nabeulensis* et *T. graeca marokkensis* (Figure 2)(Schilliger, 2007).

- *Testudo graeca graeca*

Cette tortue est communément appelée tortue du Maghreb où elle y vit et elle est plus particulièrement retrouvée au nord de l'Algérie. Des populations apparentées sont également présentes dans le Sud de l'Espagne. Cette sous-espèce est rarement importée de nos jours mais de nombreuses tortues âgées sont toujours captives en France. Sa carapace est bien bombée et de couleur jaune et noire tandis que sa tête est sombre et plus moins marquée de petites tâches claires (Schilliger, 2007).

- *Testudo graeca iberica*

Cette sous-espèce appelée tortue levantine est retrouvée en Anatolie occidentale et centrale ainsi qu'en Europe orientale. Dans les années 60 et 70, ces tortues étaient fréquemment retrouvées dans les animaleries. Contrairement à *T. graeca graeca* de couleur jaune et noire, sa couleur est peu contrastée et généralement plus foncée : la dossière est de couleur brune à olivâtre voire cuivrée et la tête est sombre et sans tâche (Schilliger, 2007)(Bour, 2012).

- *Testudo graeca nabeulensis*

Il s'agit de la tortue de Tunisie classiquement rapportée en France par les touristes. Elle est également retrouvée à l'Ouest de la Lybie (Andreu *et al.*, 2004). Cette tortue est de petite taille, dépassant rarement les 15 cm et sa couleur est très contrastée allant de jaune pâle à noire. Les tâches observables sur les écailles sont bien délimitées et celles de la cinquième écaille vertébrale sont en forme d'araignée. Sa tête est sombre mais de grandes tâches jaunes sont aisément observables.

- *Testudo graeca marokkensis*

Cette sous-espèce est appelée tortue du Maroc où elle vit et, comme la tortue de Tunisie, elle est souvent rapportée illégalement par les touristes. Sa dossière est jaune pâle et contient des tâches sombres bien délimitées qui deviennent rayonnantes au cours de la croissance. Les tâches du plastron sont de forme plus ou moins étoilées.

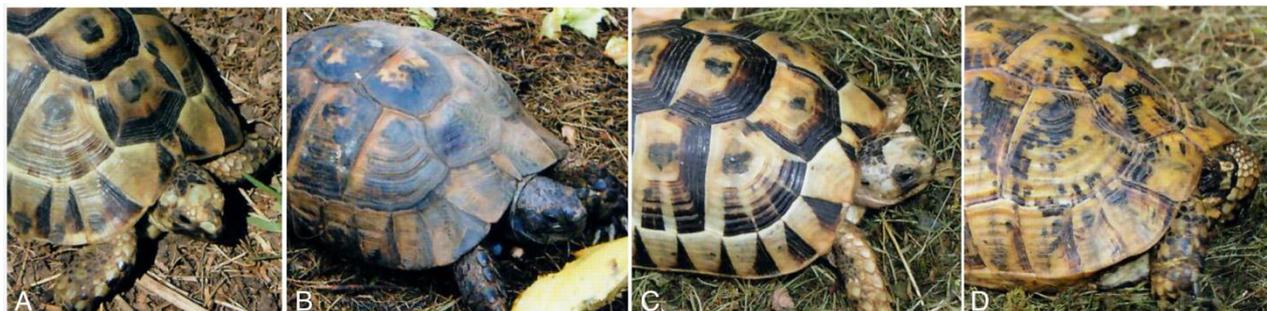


Figure 2 : sous-espèces de *Testudo graeca* retrouvées fréquemment en captivité en France : *T. graeca graeca* (A), *T. graeca iberica* (B), *T. graeca nabeulensis* (C), *T. graeca marokkensis* (D) (Schilliger, 2007).

4. Identification du sexe chez la tortue grecque

Le sexe est un paramètre à prendre en compte lors de l'interprétation de l'hémogramme chez les chéloniens. Comme expliqué dans la partie 3 I.B.1.c), l'étude de El-Mansoury et al. a montré que les mâles *Testudo graeca* avaient une concentration en érythrocytes, un PCV et une concentration en hémoglobine significativement plus élevés que les femelles de la même espèce (El-Mansoury, Hamooda and Mehdi, 2014).

Chez la plupart des espèces de chéloniens, le sexe est déterminé par la température d'incubation des œufs et non pas par génétique comme chez les mammifères et les oiseaux. En conséquence, l'ADN ne peut pas être utilisé pour déterminer le sexe. En revanche, il peut être déterminé grâce aux caractéristiques anatomiques de chaque espèce.

Chez les tortues grecques, les femelles sont plus grandes, plus larges et plus lourdes que les mâles (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004) (Willemsen and Hailey, 2003). Les mâles ont une queue plus longue et plus épaisse que les femelles (Figure 3). Ils possèdent également un plastron légèrement concave alors qu'il est plat chez les femelles. La partie supracaudale de la dossière est convexe et incurvée vers l'intérieur chez les mâles alors qu'elle est plate chez les femelles. Enfin, les mâles possèdent également une tête plus courte et plus large que les femelles bien que ce caractère soit difficilement distinguable à l'œil nu (Díaz-Paniagua and Andreu, 2009). Ces différences anatomiques sont minimales chez les juvéniles, c'est pourquoi le sexe est souvent difficile à établir avec certitude chez ces derniers (Chitty and Raftery, 2013).



Figure 3 : dimorphisme sexuel lié à la queue et à la partie supracaudale de la dossière chez la tortue grecque (Bour, 2012)

II. Distribution géographique et écologie

A. Distribution géographique

Les tortues grecques au sens large ont une vaste répartition géographique : elles sont retrouvées en Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Lybie), au Sud de l'Espagne, aux îles Baléares, en Sardaigne ou encore en Sicile mais également dans les pays de l'Europe de l'Est bordant la méditerranée et au Moyen Orient (Asie mineure, Iran, Afghanistan, Pakistan) (Bour, 2012)(Chitty and Raftery, 2013)(Díaz-Paniagua and Andreu, 2009). Comme abordé ci-dessus, toutes les sous-espèces de *Testudo graeca* ne sont pas retrouvées dans l'intégralité de cette zone géographique.

La tortue grecque n'est pas présente naturellement en France mais a été introduite. La répartition naturelle des principales sous-espèces retrouvées en captivité en France est détaillée dans la partie 1 I.B.3 et représentée ci-dessous (Figure 4).

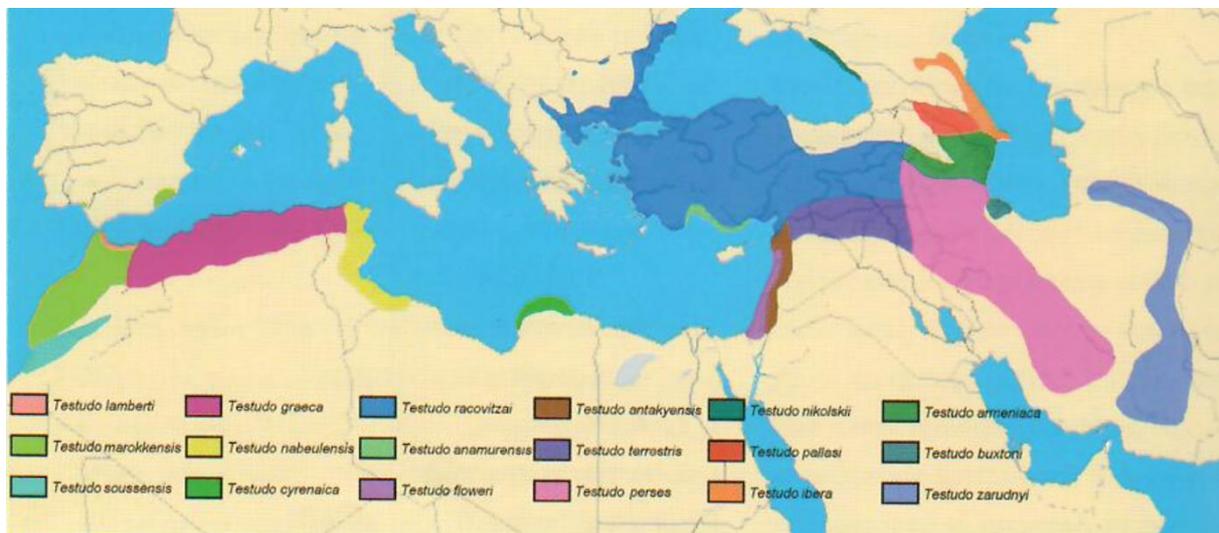


Figure 4 : aires de répartition des sous-espèces de *Testudo graeca* (Schilliger, 2007)

B. Mode de vie naturel

1. Habitat

La tortue grecque est exclusivement terrestre et se retrouve classiquement dans les zones arides et semi-arides allant du niveau de la mer à plus de 3000 m d'altitude. Elle occupe une grande variété d'habitats broussailleux et secs, de prairies et de pâturages, de dunes de sable, de forêts et de landes généralement sur un substrat sablo-calcaire. Les zones de végétation clairsemée, ainsi que les accumulations de gros rochers et de pentes raides, ont tendance à être évitées.

Là encore, l'habitat varie selon la région et la sous-espèce considérée (*Figure 5*) (Díaz-Paniagua and Andreu, 2009)(Chitty and Raftery, 2013)(Cheylan *et al.*, 2004).



Figure 5 : habitat typique des tortues grecques à la réserve Cumbres de la Galera en Espagne à gauche, et au parc National des Monts Măcin en Roumanie à droite (Soler, Martinez Silvestre and Sempere, 2009)(Díaz-Paniagua and Andreu, 2009)

2. Activité et hibernation

La tortue grecque est une espèce diurne. Elle est active tout au long de la journée surtout lors de jours non pluvieux et lorsque la température est comprise entre 5,5 à 15°C et 19 à 30°C (Díaz-Paniagua and Andreu, 2009). Son activité est accrue au printemps jusqu'au début de l'été. Les populations vivant en haute altitude hibernent mais les individus situés au niveau de la mer et profitant de températures plus clémentes ont tendance à ne pas le faire. En été, certaines populations estivent pour faire face aux températures chaudes. Ainsi, au Sud de l'Espagne, les tortues grecques hibernent de novembre à février et estivent de juin à début septembre. Au contraire, certaines populations marocaines et côtières n'hibernent pas (Andreu *et al.*, 2004).

Les périodes d'activité ne sont pas totalement synchrones entre les deux sexes : en sortie d'hibernation les mâles commencent généralement leur activité avant les femelles pour se consacrer principalement à la recherche d'une partenaire. Au contraire, entre fin juin et début juillet, alors que de nombreux mâles sont déjà inactifs, des femelles n'ayant pas encore fait leur nid sont encore actives (Díaz-Paniagua and Andreu, 2009).

3. Alimentation

Les tortues grecques se nourrissent essentiellement de végétaux, sélectionnant à la fois les feuilles vertes, les fleurs, les fruits et les pousses tendres des plantes. Dans certaines régions d'Espagne, plus de 80 espèces végétales ingérées ont été identifiées parmi lesquelles se distinguent les graminées, suivies par les légumineuses. En revanche, les tortues évitent l'ingestion de certaines plantes et les espèces végétales les plus consommées sont parfois peu abondantes en milieu naturel, c'est pourquoi certains auteurs qualifient cette espèce d'herbivore assez sélectif (Díaz-Paniagua and Andreu, 2009)(Chitty and Raftery, 2013).

Les tortues grecques consomment aussi de petits invertébrés comme des coléoptères, des vers de terres et des gastéropodes mais également des excréments. Dans certaines régions, elles se nourrissent de figes de Barbarie ainsi que de plantes cultivées comme la laitue, les tomates, les fèves, les choux-fleurs, ou encore les feuilles de pommes de terre (Andreu *et al.*, 2004)(Díaz-Paniagua and Andreu, 2009).

Pour le bien-être de l'espèce, le régime alimentaire naturel devra donc être respecté lors de vie en captivité (partie 1 III.D).

4. Reproduction

La tortue grecque est ovipare et la maturité sexuelle est atteinte, selon les individus et selon les populations, entre 5 et 9 ans chez les mâles et 6 à 14 ans chez les femelles (Andreu *et al.*, 2004). Les premières parades nuptiales sont observées en automne bien que dans certaines années très sèches, la période d'activité automnale soit très courte voire presque nulle (Díaz-Paniagua and Andreu, 2009). La principale période d'activité sexuelle commence à la fin de l'hiver et se poursuit jusqu'au début de l'été. Souvent, les femelles se reproduisent annuellement et réalisent une à quatre pontes par an, comprenant chacune un à sept œufs. Après trois à quatre mois d'incubation, les œufs éclosent en août ou en septembre (Chitty and Raftery, 2013)(Andreu *et al.*, 2004).

III. Conditions de captivité des tortues méditerranéennes

A. Déclaration et conditions de détention

La tortue grecque est considérée comme une espèce vulnérable en raison de l'exploitation illégale réalisée lors de la collecte d'animaux en milieu naturel mais également à cause des modifications de son habitat (Andreu *et al.*, 2004).

Au niveau international, la tortue grecque au sens large (*Testudo graeca*) est inscrite à l'Annexe II de la Convention de Washington depuis 1975 (CITES, no date). La convention de Berne établie en 1979 précise les actions à mener sur le terrain afin de protéger la faune inscrite à l'Annexe II comme la tortue grecque : la capture ou la perturbation des espèces, la détérioration de leur site de vie et leur commerce sont interdits (Bour, 2012).

Au niveau européen, les règlements 3626/82 et 338/97 relatent de l'application de la Convention de Washington au sein de l'Union Européenne. Calqué en majorité sur la CITES, ce règlement interdit le commerce et le transport des animaux de l'Annexe A dont fait la partie la tortue grecque. Les spécimens nés et élevés en captivité constituent cependant une exception à ces dispositions commerciales (*EUR-Lex*, no date).

Au niveau national, l'arrêté du 8 octobre 2018 fixe les conditions préalables à la détention d'espèces non domestiques comme les tortues grecques. Ainsi, la détention de 1 à 6 individus de l'espèce *Testudo graeca* requiert une déclaration préfectorale complète ainsi qu'une identification par transpondeur électronique de chacun des individus. À partir de 7 individus détenus, un certificat de capacité et une autorisation d'ouverture préfectorale sont nécessaires (*Légifrance*, no date).

B. Milieu de vie

Il est essentiel de fournir aux tortues grecques un environnement adapté aux besoins de leur espèce. En effet, chez les chéloniens de nombreuses pathologies sont liées à un mode de vie et une alimentation inadéquats. Comme nous le verrons dans la partie 1 I.B.2, une malnutrition, un stress chronique associé à un environnement inadapté ou encore une surpopulation ont des conséquences sur l'hémogramme chez les reptiles. Par exemple, le stress chronique peut être à l'origine d'une anémie centrale ou d'une lymphopénie. En consultation, il est donc primordial de se renseigner sur les conditions de vie de l'animal afin d'en tenir compte lors de l'interprétation de l'hémogramme et de les améliorer si nécessaire.

1. Vie en milieu extérieur

Dès que cela est possible, il est recommandé de maintenir les tortues grecques en milieu extérieur. En effet, l'exposition au soleil et aux rayonnements ultraviolets est indispensable au bien-être et à la santé de cette espèce méditerranéenne.

Dimensions de l'enclos et clôtures

Bien que pouvant vivre en liberté dans le jardin, il est tout de même conseillé d'aménager un enclos spacieux et sécuritaire (*Figure 6*) (Schilliger, 2007). Un minimum de 10 m² est conseillé pour un couple de tortue grecque mais il conviendra d'augmenter cette surface lorsque cela est possible. L'enclos est constitué d'un grillage résistant, assez haut pour assurer une protection contre les prédateurs et assez profondément enfoui afin d'éviter les fugues. Cependant, certains auteurs préfèrent opter pour une clôture en bois car celle-ci permet aux tortues de ne pas voir l'environnement qui les entoure. De ce fait, les tentatives de fuite sont raréfiées et le risque de blessure par abrasion de la carapace ou des membres l'est également. Enfin, un grillage aérien peut également être installé afin de protéger les tortues, notamment les juvéniles, des attaques d'oiseaux.

Aménagement de l'enclos

Les tortues grecques aiment évoluer sur des terrains accidentés, reflets de leur milieu naturel, c'est pourquoi les talus de terre sont fortement appréciés. Une pelouse plantée de trèfle, de pissenlit ou encore de plantain constitue un sol adapté pour l'enclos. Afin de recréer au maximum leur environnement naturel, des végétaux aromatiques comme le romarin, le thym, la lavande ou encore le genévrier peuvent être plantés. Des tas de végétaux constitués de paille, de feuilles ou d'herbe tondue permettront aux tortues de se réfugier lors de températures nocturnes fraîches ou lors de journées chaudes d'été. En effet, il est primordial que le milieu de vie comporte une zone ensoleillée et une zone ombragée où les tortues pourront se réfugier en cas de température excessive. La plantation d'arbres et de haies en bordure de l'enclos constitueront ainsi des zones de repos ombragées très appréciées par les tortues.

L'enclos doit également comporter un abri surélevé afin d'éviter les inondations lors de fortes pluies et un bac d'eau changée quotidiennement, relativement plat pour permettre la baignade. Une aire d'alimentation où les repas seront distribués est requise. Il est bien évidemment possible de planter des végétaux au sein de l'enclos afin que les tortues disposent directement d'une alimentation adaptée.

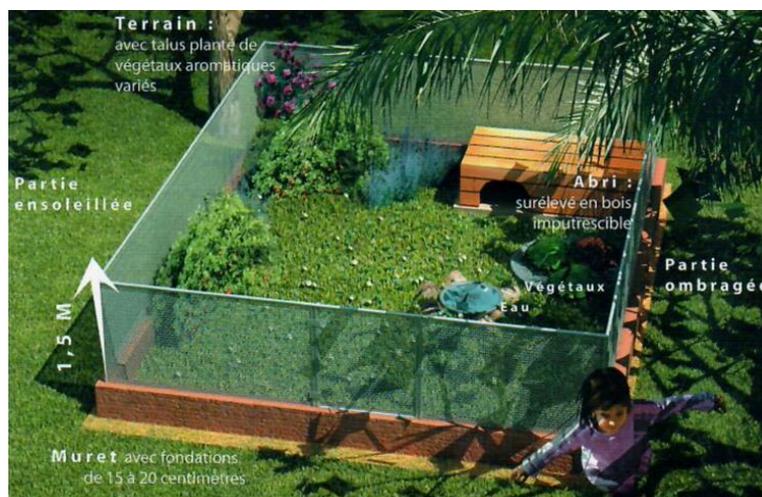


Figure 6 : exemple d'enclos extérieur adapté aux tortues méditerranéennes (Schilliger, 2007)

2. Vie en milieu intérieur

Les tortues grecques tolèrent assez mal de vivre toute l'année dans un terrarium, il est donc primordial de leur aménager un enclos à l'extérieur lorsque cela est possible. Cependant, il peut s'avérer utile de recourir au terrarium lors des périodes de transitions saisonnières, de maladie, et donc de surveillance accrue, ou encore en présence de juvéniles. Là encore, il conviendra de respecter les exigences environnementales de la tortue grecque.

Dimensions, matériaux et substrat du terrarium

Une tortue grecque adulte de moins de 10 cm de longueur requiert, au minimum, un terrarium de 150 x 80 x 50 cm. Les terrariums en verre et en plastique présentent l'avantage d'être aisément nettoyés. Cependant, il semblerait que le verre ne soit pas adapté pour les tortues terrestres car celles-ci ne comprennent pas pourquoi elles ne peuvent le traverser. Ainsi, certains auteurs recommandent davantage l'usage du bois. La mise en place de linoléum au fond du terrarium peut simplifier son nettoyage.

Le choix du substrat est discuté par de nombreux auteurs : les copeaux de bois ou les éclats de hêtre sont classiquement utilisés. Une couche foin conséquente peut également être utilisée seule ou en complément des substrats cités précédemment. Dans tous les cas, l'ingestion du substrat ne doit représenter aucun danger. Des pierres peuvent également être disposées au fond du terrarium afin de créer un environnement proche de l'habitat naturel.

Température et éclairage

Rappelons que les tortues sont des animaux ectothermes ce qui signifie que leur température interne dépend de la température environnementale. De ce fait, leur thermorégulation est assurée par déplacement entre une zone froide et une zone chaude. Il est donc primordial de créer un gradient de température au sein du terrarium grâce à un point chaud atteignant les 28 à 30°C et un point froid à environ 25°C la journée contre 21 à 23°C la nuit. Pour cela, une lampe chauffante est placée au niveau du point chaud et la température du terrarium doit être contrôlée régulièrement à l'aide d'un thermomètre .

L'éclairage du terrarium offre de la lumière mais il est indispensable qu'il fournisse des rayons ultraviolets. En effet, les UV B sont essentiels au métabolisme calcique des tortues. Ils permettent la synthèse de vitamine D3 indispensable pour l'absorption du calcium intestinal et sa fixation au sein du squelette. Les maladies métaboliques osseuses comme l'hyperparathyroïdie secondaire d'origine nutritionnelle sont fréquentes lors de manque d'exposition aux UV B chez les tortues terrestres et prédisposent à de nombreuses pathologies et troubles hématologiques .

Il existe des lampes chauffantes sources d'UV B, ce qui simplifie les installations requises. Par exemple, une lampe à vapeur de mercure fournit des UV A et B et des rayonnements infrarouges ce qui est parfaitement adapté pour une tortue grecque. La lampe doit être placée à 20 à 30 cm du sol pour permettre une absorption optimale des UV et elle doit être changée tous les 6 mois à 1 an selon les recommandations du fabricant.

En moyenne, la photopériode chez les chéloniens est de 12 heures mais elle varie en fonction de la saison : elle s'allonge en période de reproduction tandis qu'elle diminue lors de l'hibernation. Comme nous le verrons dans la partie 3 I.B.2.a), la photopériode et donc la saison ont une influence sur les paramètres hématologiques.

Humidité

Un taux d'humidité trop faible peut induire une anorexie et une déshydratation tandis qu'une humidité excessive est fréquemment associée au développement de dermatites et de pathologies respiratoires chez les chéloniens (Kirchgessner and Mitchell, 2009). L'hygrométrie de l'environnement doit donc être contrôlée régulièrement à l'aide d'un hygromètre et doit être comprise entre 30 à 55% pour les tortues grecques (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004).

Aménagement

Comme l'enclos extérieur, le terrarium doit contenir une cachette et une coupelle d'eau changée quotidiennement pour permettre l'abreuvement et la baignade.

C. Présence de congénères

Les chéloniens ne sont pas des espèces sociales, même si elles peuvent parfois être grégaires. La cohabitation est souvent une source de stress, c'est pourquoi il est recommandé de limiter le nombre de tortues par enclos et de respecter, dans l'idéal, le rapport de 1 mâle pour 4 à 5 femelles dans un enclos de 40 m² (Schilliger, 2007).

Le mélange d'espèces ou d'individus de taille très différente peut entraîner une domination voire un « harcèlement social » qui se traduit par une compétition pour la nourriture, l'eau et les cachettes. Il en résulte un stress chez les individus dominés voire un défaut de croissance (Chitty and Raftery, 2013). Des conséquences hématologiques tels qu'une anémie, une hétérophilie ou une lymphopénie peuvent être constatées (partie 3 I.B.2 et partie 3 II.A.1.a)). Au fil du temps, l'individu dominé est susceptible de développer une infection par des agents pathogènes opportunistes (Divers and Stahl, 2018). Dans de telles situations, les animaux doivent être hébergés séparément, soit de façon permanente, soit uniquement aux heures d'alimentation.

Même lors de cohabitation d'individus de la même espèce et de même taille, des combats entre mâles peuvent se produire. Un individu mâle est également susceptible de solliciter incessamment une femelle. En période de reproduction, les mâles du genre *Testudo* poursuivent et mordent les femelles. Certains auteurs considèrent que ces comportements ont pour but d'induire l'ovulation mais en captivité cela peut entraîner des dommages considérables de la carapace et des lésions cutanées chez les femelles (Chitty and Raftery, 2013).

Enfin, la cohabitation entre différentes espèces de tortues est déconseillée du fait de la potentielle transmission d'agents pathogènes entre espèces.

D. Alimentation

Les pathologies d'origine nutritionnelle sont très fréquentes chez les chéloniens, c'est pourquoi un régime alimentaire adapté doit être fourni aux tortues grecques. De plus, une malnutrition, plus ou moins associée à des conditions environnementales inadaptées, peut être à l'origine d'anomalies hématologiques comme une lymphopénie (Campbell, 2015b). Il est donc primordial de conseiller les propriétaires de reptile sur le régime alimentaire à fournir à leurs animaux mais également de garder à l'esprit l'influence hématologique que peut avoir une alimentation inappropriée. Par exemple, un régime alimentaire inadapté peut causer une hyperparathyroïdie secondaire d'origine nutritionnelle elle-même à l'origine de dommages rénaux causant une anémie centrale (Chitty and Raftery, 2013).

Les tortues grecques doivent recevoir une alimentation variée, proche de leur régime naturel et qui couvre leurs besoins nutritionnels. Les tortues mauresques sont principalement herbivores

et les végétaux proposés doivent être riches en calcium de telle sorte que le rapport phosphocalcique de la ration soit compris entre 2 et 5. En effet, du fait de l'ossification de leur carapace, les chéloniens ont des besoins élevés en calcium (Schilliger, 2007).

Ainsi, il est conseillé de distribuer quotidiennement des végétaux tels que des feuilles de pissenlit, de blette, de navet, de cresson, d'épinard et de brocoli, de la salade Romaine, des endives, de la mâche, des fanes de radis, du persil etc. Comme expliqué précédemment, des végétaux tels que le pissenlit, le plantain, le laiteron, le cresson ou encore le trèfle peuvent être plantés directement dans l'enclos extérieur. Quelques fruits peuvent également être ajoutés à la ration mais ils ne doivent pas représenter plus de 10 % des aliments distribués : figue fraîche, framboise, kiwi, fraise, mûre, tomate, melon, raisin etc. sont des aliments très appréciés par les tortues. Quelques fleurs comme les fleurs d'Hibiscus ou les pétales de roses peuvent également être proposées occasionnellement. Dans tous les cas, il est essentiel de fournir une alimentation variée et équilibrée (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004) (Schilliger, 2007).

Chez les chéloniens, les besoins hydriques sont en partie satisfaits grâce à l'eau contenue dans les aliments. Une zone de baignade comme une coupelle d'eau doit tout de même être accessible dans l'environnement afin qu'ils puissent s'y baigner et s'hydrater par voie cloacale.

E. Hibernation

Lors de l'interprétation de résultats hématologiques, il est nécessaire de prendre en compte la saison. En effet, la période hivernale et l'hibernation associée ont une influence sur plusieurs paramètres sanguins. L'étude de Lawrence et al. s'intéressant aux variations des normes hématologiques en fonction de la saison chez les tortues méditerranéennes est détaillée dans la partie 3 I.B.2.a). Les principes de l'hibernation chez les tortues méditerranéennes sont abordés ci-dessous.

Bien que largement discuté, il a été démontré qu'il est préférable de faire hiberner les tortues grecques maintenues en captivité et ce dès leur première année de vie à condition qu'elles soient nées en août ou avant. Il est cependant indispensable de s'assurer auparavant de leur bonne santé grâce, au minimum, à un examen clinique complet. Une analyse sanguine hématologique et biochimique complète et des radiographies sont également recommandées avant hibernation. Un faible état corporel, une perte de poids, un œdème, une hypoalbuminémie, une hyperuricémie, une anémie, une diarrhée ou d'autres symptômes tel qu'un écoulement nasal sont quelques-unes des contre-indications à l'hibernation (Divers and Stahl, 2018). L'hibernation peut ensuite avoir lieu en milieu intérieur ou extérieur (Schilliger, 2007).

L'hibernation extérieure requiert l'utilisation d'un abri au sein duquel les tortues se réfugient dès que la température extérieure diminue. Cette cachette doit être impérativement protégée du gel et isolée en la remplissant de terreau, de feuilles mortes, de foin ou de paille. Il est également possible de laisser les tortues s'enterrer à condition qu'une parcelle de terre soit mise à disposition et rendue inaccessible pour les rongeurs. Au printemps, les tortues sortent d'hibernation par elles-mêmes lors de la hausse des températures. Il est alors conseillé de leur faire prendre des bains d'eau tiède afin de les réhydrater et d'éliminer les toxines accumulées pendant l'hibernation.

L'hibernation intérieure se déroule selon le même principe mais une préparation à l'hibernation est nécessaire : 10 jours avant le début de l'hibernation, la tortue est mise à jeun et baignée quotidiennement dans de l'eau tiède afin de stimuler la vidange du tube digestif (Schilliger, 2007). Une diminution de la photopériode mimant les conditions climatiques naturelles est également recommandée. Puis, la tortue est placée au sein d'une caisse hermétique remplie d'un substrat isolant comme du foin. L'hibernaculum est ensuite placé dans une pièce où la température est comprise entre 5 et 10°C comme un garage ou une cave à vin (Bour, 2012). Au cours de l'hibernation, une surveillance du poids, de la léthargie de l'animal et de la température ambiante sont nécessaires. Au réveil, l'animal est réchauffé progressivement, baigné puis réalimenté (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004).

IV. Examen clinique général et particularités anatomiques des chéloniens

L'examen clinique est une étape primordiale lors de la consultation d'une tortue. En effet, il permet d'identifier toute lésion ou tout symptôme et donc de déterminer quel système organique est atteint, puis de formuler une liste d'hypothèses diagnostiques. De plus, il est primordial de garder à l'esprit que les résultats d'un hémogramme doivent toujours être interprétés en prenant en compte l'examen clinique de l'animal.

A. Anamnèse et commémoratifs

Comme pour les animaux domestiques, l'évaluation clinique commence par une anamnèse et un recueil de commémoratifs détaillés. Le recueil des commémoratifs est d'autant plus important chez les reptiles que de nombreuses affections sont liées à de mauvaises conditions de maintenance. Le propriétaire doit donc être interrogé sur l'acquisition, le sexe, le mode de vie, l'alimentation, l'hibernation et les antécédents médicaux de son animal. L'utilisation d'un questionnaire facilite le recueil d'informations et permet de n'oublier aucune étape.

Dans un second temps, l'anamnèse permet de recueillir les informations concernant le motif de consultation comme l'apparition des premiers symptômes, l'évolution de l'animal et les éventuels traitements administrés.

B. Observation à distance

L'examen clinique débute par une inspection à distance comprenant l'évaluation du comportement, de la vigilance, de la locomotion et des troubles neurologiques évidents tels qu'une paralysie ou une inclinaison de la tête (Divers and Stahl, 2018). Une évaluation préliminaire de l'aspect de la carapace et des écailles peut être réalisée avant l'examen rapproché. Enfin, un examen de l'appareil respiratoire est nécessaire et réalisable à distance. La respiration chez la tortue implique des mouvements d'avant en arrière des membres thoraciques qu'il ne faut pas prendre pour une anomalie. La fréquence respiratoire peut donc être déterminée à distance en se basant sur ces mouvements. Aucun son ne doit être associé à la respiration. Une dyspnée marquée se traduit par une respiration bouche ouverte, un port de tête haut et des mouvements des membres amplifiés (Chitty and Raftery, 2013).

C. État corporel et mesures du poids et de la taille

La pesée est une partie extrêmement importante de l'examen clinique. Il est d'ailleurs conseillé aux propriétaires de peser et de mesurer régulièrement leurs tortues. En effet, une tortue ne doit jamais perdre de poids sauf au cours de l'hibernation ou après une ponte (Schilliger, 2007). La longueur, la largeur, la hauteur de la carapace et le poids doivent donc être mesurés régulièrement afin de fournir des données de référence pour chaque individu. Une attention particulière est requise lors de la pesée car les chéloniens possèdent de grandes vessies : une réduction importante du poids corporel peut être constatée après vidange de la vessie ce qui est une réponse courante au stress (Chitty and Raftery, 2013).

L'état corporel d'une tortue peut être évalué en comparant les mesures de poids et de taille actuelles avec celles obtenues précédemment. Il existe également des normes établies selon les espèces mais cette méthode d'évaluation manque de précision (Chitty and Raftery, 2013). Il est donc plus fiable de se fier à des critères cliniques bien qu'assez délicats à visualiser sans expérience clinique.

Lors de perte de poids importante, la peau de la tortue se ride et semble être en excès. La palpation des fosses pré-fémorales chez une tortue cachectique est creuse. Au contraire, les tortues en surpoids accumulent de la graisse dans les fosses pré-fémorales et de chaque côté du cou. Attention cependant à ne pas confondre cet excès de graisse avec un œdème (Chitty and Raftery, 2013). L'appréciation du tonus musculaire peut également être un bon indicateur de l'état d'embonpoint : la musculature recouvrant le radius, l'ulna et le tibia peut être palpée et doit être relativement charnue (Kirchgessner and Mitchell, 2009).

Même si avec de l'expérience il est relativement aisé de juger de l'état d'embonpoint d'une tortue, la formule théorique suivante peut être utilisée pour estimer la concordance entre le poids théorique et la taille d'une tortue grecque :

$$\text{Poids théorique (en grammes)} = 0,191 \times L^3,$$

où L représente la distance entre l'extrémité antérieure du plastron et l'extrémité postérieure de l'écaille supracaudale, exprimée en cm (Schilliger, 2007).

Cette relation mathématique permet d'évaluer le poids théorique que devrait faire une tortue en fonction de sa taille mais il existe de nombreuses raisons pour lesquelles le poids d'une tortue saine peut différer de ce poids théorique. Cette relation est donc à utiliser avec précaution et à interpréter selon le contexte clinique.

D. Examen rapproché

1. Examen de la tête et des structures associées

- Cavité buccale

La cavité buccale doit toujours être examinée, en particulier pour détecter des signes d'inflammation, d'infection ou de corps étranger. La coloration des muqueuses buccales doit être examinée et est physiologiquement rose pâle. Le larynx, difficile à visualiser, est disposé en arrière de la langue. Une inflammation du larynx doit être recherchée et est compatible avec une atteinte respiratoire (Divers and Stahl, 2018). L'ulcération des muqueuses buccales, la présence d'un érythème, d'une hémorragie ou de pétéchies ainsi que la formation de membranes diphtéroïdes jaunâtres au sein de la cavité buccale sont des signes de stomatite (Kirchgessner and Mitchell, 2009).

- Narines

Une obstruction et des écoulements nasaux doivent être recherchés. L'érosion cutanée et la dépigmentation des narines sont souvent le reflet d'une atteinte chronique des voies respiratoires supérieures comme une rhinite, affection très fréquente chez la tortue grecque (Kirchgessner and Mitchell, 2009).

- Bec et mâchoire

La mâchoire et le bec doivent être palpés. Une mâchoire molle est le reflet d'une ostéodystrophie fibreuse secondaire à une hyperparathyroïdie d'origine nutritionnelle. Une instabilité de la mâchoire peut résulter d'un traumatisme ou d'une fracture. Une surcroissance du bec est souvent associée à une maladie nutritionnelle comme une carence en vitamine A ou une ostéodystrophie fibreuse, ou à un défaut d'usure lors de la prise alimentaire (Kirchgessner and Mitchell, 2009).

- Yeux et paupières

La position des yeux au sein des orbites doit être examinée de près. Une énophtalmie bilatérale est observée en cas de déshydratation sévère ou de cachexie, alors qu'une exophtalmie bilatérale peut être observée lors d'œdème généralisé. L'énophtalmie unilatérale est plutôt en faveur d'une blessure ou un traumatisme et l'exophtalmie unilatérale en faveur d'un traumatisme ou d'une compression par un abcès ou une masse tumorale (Kirchgessner and Mitchell, 2009).

Les paupières doivent être ouvertes et non enflammées. La cornée et le cristallin doivent être transparents et les yeux brillants. Un examen ophtalmologique associé à un test à la fluorescéine est conseillé en cas d'anomalies oculaires. Les conjonctivites, les ulcères cornéens et les opacifications sont des atteintes fréquentes chez les chéloniens. Par exemple, une dégénérescence de la rétine peut avoir lieu suite à une congélation lors de l'hibernation (Divers and Stahl, 2018).

- Écailles tympaniques

Les écailles tympaniques sont circulaires et situées de part et d'autre de la tête, caudoventralement à l'œil (Chitty and Raftery, 2013). Celles-ci recouvrent les membranes tympaniques et doivent être examinées afin de détecter des signes de gonflement associés à un abcès auditif, affection fréquente chez les chéloniens, ou à une hypovitaminose A. Un pyogranulome du tympan peut également être mis en évidence par la présence d'un exsudat émanant de la trompe d'Eustache au niveau de la cavité buccale (Divers and Stahl, 2018).

2. Examen de la peau et de la carapace

La carapace est constituée d'une partie ventrale appelée plastron et d'une partie dorsale, la dossière. La dureté et la conformation de ces deux éléments doivent être évaluées. Les carapaces mal minéralisées sont généralement le résultat d'une hyperparathyroïdie nutritionnelle secondaire causée par des carences alimentaires ou un manque d'exposition aux UV B.

L'origine de l'aspect pyramidal de certaines carapaces de tortues est largement discutée et est certainement multifactorielle : humidité ambiante réduite, températures nocturnes élevées, ingestion excessive de protéines ou encore accès limité à l'eau sont des facteurs mis en cause (Kirchgessner and Mitchell, 2009) (Divers and Stahl, 2018).

La recherche de traumatisme et de signes d'infection est également nécessaire. Les infections de la carapace peuvent se manifester par un ramollissement des écailles et de l'érythème, voire des écoulements purulents et une odeur nauséabonde. Une teinte rougeâtre du plastron suggère quant à elle une septicémie (Kirchgessner and Mitchell, 2009).

Le tégument doit également être examiné : les parasites, les problèmes de mue, les plaies et les infections résultant d'attaques de prédateurs ou de congénères ne sont pas rares. Une déshydratation peut être suspectée lors d'une diminution de l'élasticité de la peau (Kirchgessner and Mitchell, 2009). Enfin, un tissu cicatriciel de couleur plus claire se met en place après une perte de peau importante tandis que les zones de brûlures apparaissent plus foncées (Chitty and Raftery, 2013).

3. Examen des membres

Les membres doivent être soigneusement palpés et l'amplitude des mouvements de chaque articulation doit être évaluée. Pour cela, les membres sont extériorisés de la carapace en exerçant une traction constante. Chaque membre doit être comparé à l'appendice opposé pour détecter une anomalie asymétrique, telle qu'une fracture osseuse ou une anomalie articulaire (Kirchgessner and Mitchell, 2009). Les gonflements des membres et des articulations sont souvent dus à une fracture, une ostéomyélite, une arthrite septique ou plus rarement à une néoplasie.

L'extrémité distale des membres doit également être examinée. Les anomalies de griffes sont souvent en lien avec une boiterie ou des conditions d'élevage inappropriées.

4. Examen du cœlome

Le cœlome peut être palpé en insérant un ou deux doigts dans les fosses pré-fémorales situées juste devant les membres postérieurs. La présence d'une ascite, d'une masse ou d'un œuf calcifié peut ainsi être évaluée par palpation (Kirchgessner and Mitchell, 2009).

5. Examen du cloaque

La présence d'érythème, d'œdème, de prolapsus ou de traumatisme doit être recherchée. Un examen cloacal digital est parfois nécessaire en cas de suspicion de dystocie ou d'exploration de plaies (Kirchgessner and Mitchell, 2009).

6. Examen des matières fécales et urinaires

Le stress engendré par la consultation provoque souvent l'émission de matières fécales et d'urines. Bien que non stériles, des analyses de laboratoires peuvent être réalisées sur ses prélèvements si cela semble nécessaire (Divers and Stahl, 2018).

7. Auscultation cardiaque et respiratoire

Du fait de la carapace et du manque de peau accessible, les chéloniens sont très difficiles à ausculter. Les moniteurs Doppler sont préférés aux stéthoscopes : la sonde est alors placée dans la fenêtre de peau située entre la région cervicale et le membre antérieur et dirigée vers le cœur. Cependant, l'auscultation est généralement d'une valeur limitée (Divers and Stahl, 2018).

L'auscultation des champs pulmonaires chez les chéloniens est également très difficile et de ce fait, rarement réalisée. L'utilisation d'un chiffon humide sous le stéthoscope permet de réduire les sons générés par les frottements du stéthoscope contre la carapace (Chitty and Raftery, 2013). Chez les patients anesthésiés, un stéthoscope œsophagien permet l'auscultation cardiaque et respiratoire (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004).

PARTIE 2 : ANALYSE HÉMATOLOGIQUE CHEZ LES REPTILES ET PLUS PARTICULIÈREMENT CHEZ LA TORTUE GRECQUE

I. Les cellules sanguines : rôles et caractéristiques chez les reptiles

A. Hématopoïèse et vie des cellules sanguines

Chez les reptiles, les sites hématopoïétiques comprennent principalement la moelle osseuse, le foie et la rate mais ceux-ci sont variables selon l'espèce et l'âge des individus. Les cellules souches myéloïdes sont des cellules multipotentes présentes dans la moelle osseuse et donnant naissance à tous les types cellulaires (Jacobson and Garner, 2020).

Bien que largement étudiée chez les mammifères, peu d'études s'intéressent à l'hématopoïèse chez les reptiles. De nouvelles recherches sont nécessaires pour comprendre davantage les mécanismes mis en jeu.

1. La lignée rouge

a) Érythropoïèse

(1) Organes lymphoïdes sièges de l'érythropoïèse

Au cours de la vie embryonnaire des reptiles, le sac vitellin semble être le site érythropoïétique primaire unique (Vasse and Beaupain, 1981). En effet, la moelle osseuse ne devient active qu'à la naissance.

L'érythropoïèse post-natale (et la granulopoïèse) des reptiles se produit principalement dans l'espace extravasculaire de la moelle osseuse bien que le foie et la rate aient également une fonction hématopoïétique aux premiers stades de développement (Claver and Quaglia, 2009) (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

Chez les reptiles, la moelle osseuse est située dans les cavités médullaires de certains os du crâne et des os longs chez les lézards, les chéloniens et les crocodiliens ainsi que dans les cavités médullaires des côtes et des vertèbres chez les serpents. Elle peut également être retrouvée au sein du plastron, de la carapace et du bassin chez les chéloniens (Jacobson, 2007).

Chez les reptiles, les érythrocytes matures peuvent également se diviser dans le sang périphérique pour former des cellules filles (*Figure 7*) (Sykes and Klaphake, 2015). Cette observation est relativement fréquente même chez des animaux sains mais peut également être le reflet d'une inflammation, d'une anorexie, d'une réponse érythrocytaire régénérative ou encore de la période post-hibernation (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004).

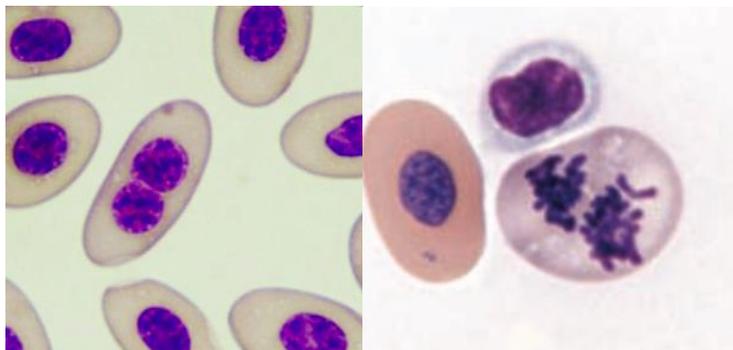


Figure 7 : à gauche, érythrocyte binucléé dans le sang circulant d'une tortue d'Hermann (*Testudo hermanni*) – coloration rapide Hemacolor. A droite, polychromatophile en mitose chez une tortue anémiée (espèce non précisée) – coloration de Wright-Giemsa (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013) (Jacobson, 2007)

(2) Stades de maturation

Les stades de maturation des érythrocytes sont similaires à ceux des mammifères et des oiseaux mais à la différence des mammifères, les érythrocytes matures sont souvent plus larges que les érythrocytes immatures (Campbell and Ellis, 2007).

La cellule précurseur des érythrocytes est le proérythroblaste, aussi appelé rubriblaste. Il s'agit d'une cellule ronde contenant un grand noyau rond et une chromatine non condensée. Le cytoplasme est basophile et agranulaire et apparaît généralement comme une bande étroite entourant le noyau. De petites vésicules peuvent être présentes le long de la membrane cellulaire. Celles-ci serviront pour l'incorporation de la ferritine utilisée dans la synthèse de l'hémoglobine (Campbell and Ellis, 2007).

Cette cellule se différencie ensuite en érythroblaste basophile ou prorubricyte, très similaire au proérythroblaste malgré une condensation plus marquée de la chromatine.

Le troisième stade de maturation est l'érythroblaste polychromatophile, aussi appelé rubricyte. Cette cellule est plus petite et commence tout juste à s'allonger pour développer une forme ovalaire. La taille du noyau est réduite et la chromatine se condense et s'agglomère davantage. Le cytoplasme est petit et de couleur claire en raison de la synthèse de l'hémoglobine. Le rubricyte peut être classé en rubricyte basophile, rubricyte polychromatophile précoce ou rubricyte polychromatophile tardif. C'est typiquement à ce stade que les érythrocytes reptiliens sont libérés dans la circulation sanguine (Campbell and Ellis, 2007).

Le dernier précurseur avant obtention d'un érythrocyte mature est le réticulocyte ou érythrocyte polychromatophile. Cette cellule est plus large et ovale, et possède un cytoplasme abondant et une chromatine nucléaire qui n'est pas complètement condensée.

Enfin, l'érythrocyte mature se caractérise par une forme ovale aplatie, un noyau central contenant une chromatine très condensée de couleur plus foncée et un cytoplasme rouge clair à jaunâtre.

Les différents stades de maturation sont présentés ci-dessous (*Figure 8*).

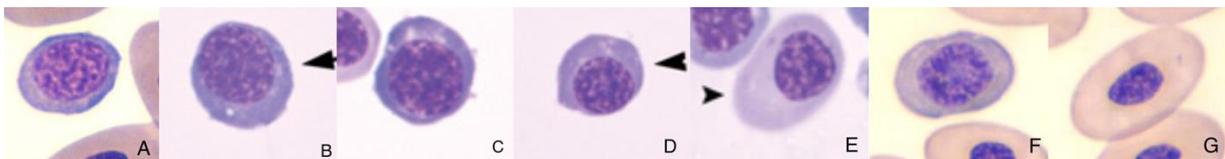


Figure 8 : différents stades de maturation d'un érythrocyte observés sur ponction de moelle osseuse (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013)(Campbell, 2015b)

A : proérythroblaste chez un iguane vert (Iguana iguana) – coloration rapide Hemacolor.

B : prorubricyte chez un iguane vert (Iguana iguana) – coloration de Wright-Giemsa.

C : rubricyte basophile chez un iguane vert (Iguana iguana) – coloration de Wright-Giemsa.

D : rubricyte polychromatophile précoce chez un iguane vert (Iguana iguana) – coloration de Wright-Giemsa.

E : rubricyte polychromatophile tardif chez un iguane vert (Iguana iguana) – coloration de Wright-Giemsa.

F : réticulocyte chez une tortue d'Hermann (Testudo hermanni) – coloration rapide Hemacolor.

G : érythrocyte chez une tortue d'Hermann (Testudo hermanni) – coloration rapide Hemacolor.

En résumé, au cours de l'érythropoïèse la cellule précurseur qu'est le proérythroblaste subit un allongement jusqu'à obtention d'une forme ovale aplatie, une diminution de la taille du noyau ainsi qu'une condensation de la chromatine nucléaire (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

Le cytoplasme devient de plus en plus grand et en raison de l'augmentation de la synthèse d'hémoglobine, le caractère éosinophilique s'accroît (Campbell and Ellis, 2007).

Par ailleurs, les reptiles possèdent plusieurs hémoglobines différentes. Une étude menée chez des tortues cistudes a mis en évidence plusieurs types d'hémoglobine chez des adultes et chez des embryons. Il semble qu'un type d'hémoglobine soit synthétisé durant toute la vie. Les hémoglobines embryonnaires persistent quant à elles plus d'un an après l'éclosion tandis que les hémoglobines typiquement adultes apparaissent peu avant l'éclosion (Vasse and Beaupain, 1981).

b) Régulation de l'érythropoïèse

Les études concernant la régulation de la production d'érythrocytes chez les reptiles sont peu nombreuses.

Ainsi, l'injection d'érythropoïétine urinaire humaine influence le nombre d'érythrocytes et la concentration en hémoglobine chez le lézard de jardin (*Calotes versicolor*) et la couleuvre à damnier (*Xenochrophis piscator*) suggérant qu'une molécule de type érythropoïétine puisse être impliquée dans la régulation de l'érythropoïèse chez ces espèces (Wickramasinghe, Shiels and Wickramasinghe, 2008).

L'érythropoïèse est également régulée par l'environnement chez les reptiles. D'après une étude réalisée chez les tortues peintes (*Chysemys picta*), des stimulations érythropoïétiques ont lieu consécutivement aux stress environnementaux tel que l'hypoxie ou l'hémorragie (Meints *et al.*, 1975). Cette réponse est cependant plus longue à se mettre en place que chez les mammifères.

c) Durée de vie des érythrocytes

La durée de vie des érythrocytes est bien plus importante que celle des mammifères : elle atteint 600 à 800 jours contre 2 à 5 mois chez les mammifères (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013). Cette longévité s'explique par le faible taux métabolique des reptiles. A l'issue de cette durée, les vieux érythrocytes subissent une mort cellulaire programmée et sont éliminés par les phagocytes au sein de la rate.

2. La lignée blanche

a) Granulopoïèse

(1) Organes lymphoïdes sièges de la granulopoïèse

Tout comme l'érythropoïèse, la granulopoïèse post-natale se déroule principalement dans la moelle osseuse (Claver and Quaglia, 2009). Le foie et la rate ont également un rôle dans la granulopoïèse aux premiers stades de développement. En effet, la formation de granulocytes a été observée dans le cortex superficiel hépatique dès 42 jours d'incubation chez des œufs de tortues cistudes (*Emys orbicularis*) et la couche granulopoïétique hépatique est restée fonctionnelle chez la jeune tortue (Vasse and Beaupain, 1981).

(2) Stades de maturation

La cellule précurseur des granulocytes est le myéloblaste. Cette cellule possède un cytoplasme de taille modérée, agranulaire et légèrement basophile ainsi qu'un grand noyau ovoïde central à légèrement excentrique.

Au cours de la maturation, le myéloblaste se différencie en promyélocyte puis en myélocyte, en métamyélocyte puis en band cell et enfin en granulocyte mature (Campbell and Ellis, 2007).

Durant ce processus, la taille de la cellule diminue, son cytoplasme perd légèrement sa basophilie, la chromatine nucléaire se condense de plus en plus et le noyau change de forme, passant de rond à segmenté (*Figure 9*) (Campbell and Ellis, 2007).

Les granulocytes acidophiles, c'est à dire les hétérophiles et les éosinophiles, sont dérivés de lignées cellulaires différentes et leurs granules cytoplasmiques caractéristiques et spécifiques apparaissent aux stades des myélocytes et des métamyélocytes. Ces granules sont de plus en plus nombreux à mesure que la maturation se poursuit.

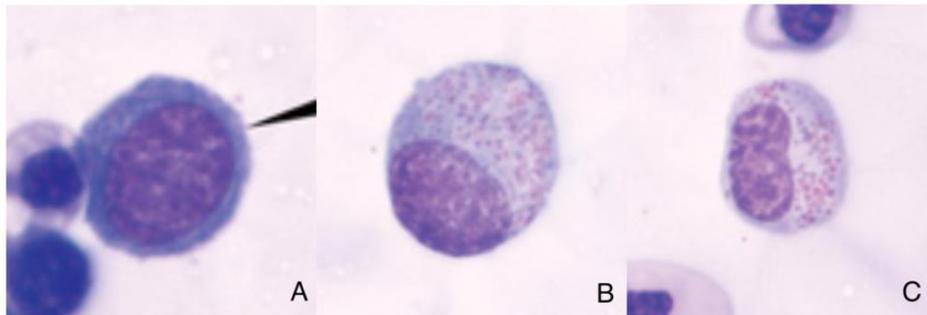


Figure 9 : différents stades de maturation d'un granulocyte hétérophile observés sur ponction de moelle osseuse d'un iguane vert (*Iguana iguana*) - coloration de Wright-Giemsa. A : myéloblaste. B : promyélocyte. C : myélocyte hétérophile (Campbell, 2015b)

b) *Lymphopoïèse*

Le processus de lymphopoïèse des reptiles ressemble à celui des mammifères. La lymphopoïèse a lieu dans la moelle osseuse, la rate mais également dans d'autres organes (Claver and Quaglia, 2009).

Les précurseurs lymphoïdes proviennent du sac vitellin ou de la moelle osseuse puis, après un passage dans la circulation sanguine, la différenciation des lymphocytes T se déroule dans le thymus. Ce dernier est le premier organe lymphoïde à se développer chez les reptiles puis il subit une involution saisonnière cyclique s'accroissant avec l'âge (Jacobson, 2007). Une fois différenciés, les lymphocytes T se propagent au foie, à la rate, aux intestins et à d'autres tissus contenant des tissus lymphoïdes comme le tractus respiratoire (Campbell and Ellis, 2007).

Le site de développement des lymphocytes B est actuellement inconnu (Claver and Quaglia, 2009).

3. La thrombopoïèse

Les thrombocytes reptiliens sont dérivés de la moelle osseuse.

La thrombopoïèse débute avec le thromboblaste. Il s'agit d'une petite cellule ronde à ovale contenant un noyau rond ponctué de chromatine. Puis, le thromboblaste se différencie en thrombocyte immature. Ce stade peut se diviser en 3 groupes selon le degré de maturation : thrombocyte immature précoce, moyen ou tardif. Au cours de sa différenciation, la taille de la cellule diminue, elle prend une forme elliptique et son cytoplasme perd progressivement son caractère basophile. Enfin, la chromatine nucléaire se condense et des granulations spécifiques apparaissent.

B. Rôle des cellules sanguines

1. Érythrocytes

Les érythrocytes des reptiles ont le même rôle que ceux des mammifères : il s'agit de cellules spécialisées dans le transport des gaz respiratoires (Claver and Quaglia, 2009). Ils contiennent de l'hémoglobine transportant l'oxygène vers les tissus et le dioxyde de carbone depuis les tissus.

Comme cité précédemment, la plupart des reptiles possèdent plusieurs types d'hémoglobine et leurs structures semblent être similaires chez les différentes espèces de reptiles. Cependant, il existe de légères différences dans la structure moléculaire de l'hémoglobine entraînant une variation significative de l'affinité de l'oxygène selon les espèces et selon les individus. L'affinité la plus élevée est rapportée chez les lézards, tandis que la plus faible est rapportée chez les chéloniens (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

2. Leucocytes

Chez les reptiles, les leucocytes sont classiquement divisés en deux catégories : les granulocytes et les cellules mononucléées.

Parmi les granulocytes, les hétérophiles et les éosinophiles sont caractérisés par des granules acidophiles, tandis que les basophiles possèdent des granules basophiles. Chez les serpents et certains lézards, la présence d'éosinophiles est controversée mais ces cellules sont bien différenciées chez les chéloniens et les crocodiles (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

Parmi les cellules mononucléées figurent les lymphocytes et les monocytes. Les azurophiles sont des cellules typiques des Squamates (serpents et lézards) et sont structurellement et chimiquement similaires aux monocytes. Leur classification précise est encore très controversée mais ils sont considérés comme des formes immatures de monocytes ou des monocytes contenant des granules azurophiles (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013)(Campbell, 2015b). Non retrouvés chez les chéloniens, nous ne détaillerons pas les caractéristiques des azurophiles.

a) *Hétérophiles*

D'après des colorations cytochimiques et des études structurales, les hétérophiles des reptiles sont considérés comme l'équivalent des polynucléaires neutrophiles des mammifères (Jacobson and Garner, 2020). Les hétérophiles ont d'ailleurs le même fonctionnement que les neutrophiles des mammifères, leur premier rôle étant la phagocytose de micro-organismes (Claver and Quaglia, 2009).

Ainsi, en cas d'inflammation, les hétérophiles migrent vers les sites enflammés et phagocytent les pathogènes. Les hétérophiles sont des cellules à haut pouvoir phagocytaire et possèdent un large spectre d'activité antimicrobienne (Claver and Quaglia, 2009). Comme chez les oiseaux, la destruction des micro-organismes repose sur des mécanismes indépendants de l'oxygène (Campbell, 2014).

Enfin, ces leucocytes peuvent s'accumuler dans les tissus enflammés, formant des foyers hétérophiliques. Des macrophages entourent ensuite les agrégats nécrotiques d'hétérophiles : il y a alors formation de granulomes hétérophiliques (Montali, 1988). D'ailleurs, les reptiles semblent réagir à un plus large spectre d'agents infectieux en formant des granulomes que les mammifères (Montali, 1988).

b) *Éosinophiles*

Ce type de leucocytes est rare voire absent chez la plupart des serpents mais il est bien décrit chez les tortues.

La fonction des éosinophiles reste à ce jour très peu étudiée chez les reptiles. Ces cellules sont capables de phagocytose et ont des propriétés anti-microbiennes. En outre, une éosinophilie est souvent associée à du parasitisme sans que les mécanismes physiologiques aient été décrits (Divers and Stahl, 2018).

c) *Basophiles*

Le rôle des basophiles est également mal compris chez les reptiles mais il semblerait qu'ils aient un rôle similaire à ceux des mammifères (Jacobson and Garner, 2020).

Ces cellules sont capables de libérer de l'histamine lors de leur dégranulation et semblent jouer un rôle important dans les réactions d'hypersensibilité immédiate (Claver and Quaglia, 2009) (Divers and Stahl, 2018). Une autre étude réalisée chez la tortue serpentine (*Chelydra serpentina*) a également mis en évidence la présence d'immunoglobulines à la surface des basophiles et considère que le rôle immunitaire des basophiles serait analogue à celui des basophiles des mammifères (Mead, Borysenko and Findlay, 1983).

d) *Lymphocytes*

Chez les reptiles, les lymphocytes ont un fonctionnement fortement similaire à celui des mammifères. En effet, les lymphocytes B produisent des immunoglobulines réceptrices d'antigènes impliquées dans l'immunité humorale, tandis que les lymphocytes T participent à l'immunité à médiation cellulaire (Claver and Quaglia, 2009).

Malgré de nombreuses similitudes, la réponse immunitaire reptilienne et notamment humorale diffère de celle des mammifères :

- Chez les reptiles, les lymphocytes B libèrent des anticorps après une période de latence d'environ une semaine. Cependant, le pic de production des anticorps est plus tardif chez les reptiles que chez mammifères : chez les reptiles le pic de production d'anticorps est atteint en six à huit semaines contre deux semaines chez les mammifères (Zimmerman *et al.*, 2010).
- Après une immunisation secondaire, la période de latence est raccourcie mais souvent aucune augmentation des titres par rapport à la réponse primaire n'est observée, contrairement aux mammifères (Zimmerman *et al.*, 2010).
- Les réponses immunologiques des reptiles sont fortement influencées par l'environnement, la saison et la température. Ainsi, de basses températures peuvent inhiber la réponse immunitaire chez les reptiles (Mader, 2006).

Enfin, des lymphocytes B dotés de capacités phagocytaires ont également été mis en évidence chez les tortues de Floride (*Trachemys scripta*) (Zimmerman *et al.*, 2010).

e) *Monocytes*

Comme chez les mammifères, les monocytes font partie du système monocytes-macrophages. Ils constituent donc un pool de cellules de remplacement des macrophages tissulaires (Claver and Quaglia, 2009). Les macrophages réalisent alors la phagocytose dans les tissus, comme cela se produit chez les mammifères. Les monocytes permettent également, par l'intermédiaire des macrophages, la formation de granulomes et de cellules géantes (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

3. Thrombocytes

Comme chez les mammifères, le principal rôle des thrombocytes est l'hémostase.

En cas de lésion vasculaire, les plaquettes adhèrent à la membrane basale vasculaire lésée et déclenchent la formation du clou plaquettaire grâce aux étapes d'activation et d'agrégation plaquettaire. L'arrêt rapide du saignement est contrôlé par la vasoconstriction des vaisseaux sanguins et la formation du bouchon plaquettaire sur le site de la blessure. En parallèle, les plaquettes sécrètent de la thromboplastine impliquée dans l'hémostase secondaire et permettant la polymérisation du fibrinogène puis la stabilisation du caillot sanguin (*Figure 10*) (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

Les études comparant la coagulation des reptiles à celle des mammifères sont difficiles à mettre en œuvre, c'est pourquoi les mécanismes de l'hémostase secondaire sont encore peu connus. Certains auteurs confirment l'existence du facteur tissulaire, de la prothrombine, du facteur V ainsi que du fibrinogène chez les reptiles. La voie extrinsèque semble être le principal initiateur de la coagulation chez les reptiles, la voie intrinsèque jouant un rôle moindre (Nevill, 2009).

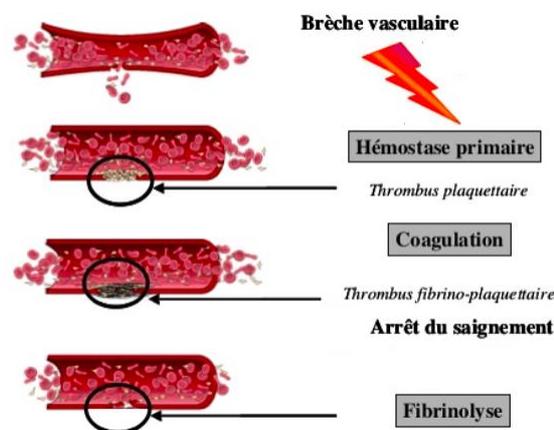


Figure 10 : mécanisme d'hémostase (de Moerloose and Boehlen, 2005)

Enfin, certains auteurs considèrent que les thrombocytes seraient capables de phagocytose chez les reptiles (Divers and Stahl, 2018).

Chez les reptiles, les érythrocytes et les plaquettes possèdent donc les mêmes fonctions principales que chez les mammifères à savoir respectivement le transport des gaz respiratoires et l'hémostase primaire. Les thrombocytes pourraient également posséder des propriétés phagocytaires.

Concernant la lignée blanche, les hétérophiles, équivalents des polynucléaires neutrophiles des mammifères, jouent un rôle primordial dans l'inflammation et la phagocytose de micro-organismes. Le rôle des éosinophiles est à ce jour peu connu mais ils possèdent des propriétés phagocytaires et anti-microbiennes. La fonction des basophiles est également mal connue mais ils libèrent de l'histamine en se dégranulant. Les lymphocytes sont, tout comme chez les mammifères, divisés en lymphocytes T et B et sont impliqués respectivement dans l'immunité à médiation cellulaire et l'immunité humorale. Les lymphocytes B pourraient également être capables de phagocytose chez certaines espèces. Enfin, les monocytes ont la même fonction que chez les mammifères et permettent l'action des macrophages une fois leur migration dans les tissus réalisée.

C. Morphologie et dimensions des cellules

1. Chez les reptiles

a) *Lignée rouge*

Forme et taille

Les érythrocytes reptiliens sont elliptiques et de grande taille, d'une longueur de 14 à 23 μm et d'une largeur de 8 à 14 μm . Les formes de la cellule et du noyau varient selon les espèces (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013). Ainsi, les érythrocytes de forme ronde sont plus fréquemment observés chez les chéloniens et certaines espèces de serpent (*Figure 11*) (Campbell, 2014).

Noyau

Contrairement à ceux des mammifères, les érythrocytes reptiliens sont nucléés. Le noyau est rond à ovale, central, et contient une chromatine violette dense. Les marges du noyau sont très souvent irrégulières. Comme cité précédemment, la forme du noyau varie selon l'espèce de reptile : chez les chéloniens, les noyaux sont particulièrement ronds et centraux (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

Des érythrocytes sans noyau appelés érythroplastides sont parfois observés et sont une découverte fortuite, surtout chez les serpents (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013). Chez les chéloniens, l'observation de mitoses ou de binucléations est relativement fréquente. Bien que des causes pathologiques doivent être recherchées, les mitoses érythrocytaires peuvent également être observées chez des individus sains (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004). Les pathologies à l'origine de ces divisions cellulaires sont détaillées dans la partie 2 II.C.5.f)(1)(a).

Cytoplasme

Avec une coloration de type Romanowsky comme la coloration de Wright, le cytoplasme est coloré uniformément en orange-rose (Campbell and Ellis, 2007).

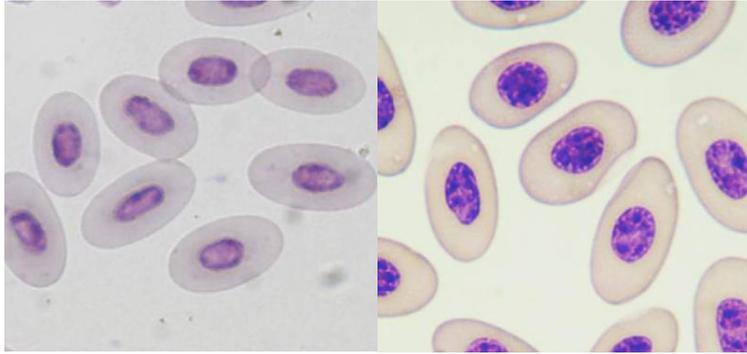


Figure 11 : érythrocytes d'aspect normal. A gauche, érythrocytes de *Pogona vitticeps* – coloration Diff-Quick. A droite, érythrocytes de *Testudo hermanni boettgeri* - Coloration rapide Hemacolor (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013)

Chez de nombreuses espèces de reptiles, des inclusions basophiles rondes plus ou moins irrégulières sont fréquemment observées dans le cytoplasme des érythrocytes (*Figure 12*). Ces inclusions représentent très souvent un artéfact de la préparation des frottis et ne sont pas considérées comme pathologiques (Campbell and Ellis, 2007). Les inclusions érythrocytaires les plus fréquentes et leurs significations sont décrites dans la partie 2 II.C.5.f)(1)(b).

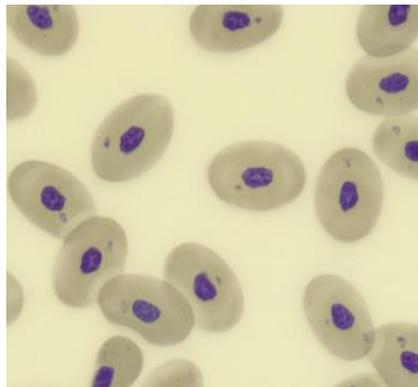


Figure 12 : érythrocytes contenant des inclusions cytoplasmiques basophiles irrégulières considérées comme des artéfacts chez une tortue verte (*Chelonia mydas*) - Coloration de Wright-Giemsa (Campbell, 2014)

Les derniers précurseurs avant l'obtention d'érythrocytes matures sont les réticulocytes. Ces cellules sont plus rondes que les érythrocytes, leur cytoplasme est plus basophile et elles possèdent un noyau plus grand contenant une chromatine moins dense (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013). Les réticulocytes apparaissent comme des érythrocytes polychromatophiles (*Figure 13*) en coloration de Romanowsky, c'est pourquoi ils sont souvent considérés comme équivalents dans la littérature (Campbell and Ellis, 2007)(Divers and Stahl, 2018). Leur présence dans le sang est normale mais ils ne doivent pas représenter plus de 2,5% de la population d'érythrocyte (Mader, 2006).

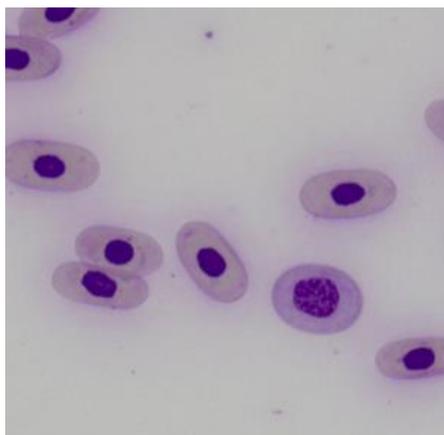


Figure 13 : érythrocyte polychromatophile parmi des érythrocytes chez une tortue boîte (*Terrapene carolina triunguis*) – Coloration de Wright-Giemsa (Campbell, 2014)

Des formes immatures d'érythrocytes et des vieux érythrocytes sont également observables au sein du frottis sanguin. Leur description est détaillée dans la partie 2 II.C.5.f)(1)(a).

b) Lignée blanche
(1) Hétérophiles

Les hétérophiles sont généralement les granulocytes les plus nombreux, suivis des éosinophiles et des basophiles. Chez certains crocodiliens et chéloniens, les hétérophiles peuvent représenter plus de 50 % du différentiel leucocytaire chez un animal sain (Divers and Stahl, 2018).

Forme et taille

Il s'agit de cellules rondes aux bords parfois irréguliers et mesurant entre 10 et 23 µm de diamètre (Divers and Stahl, 2018). Des pseudopodes peuvent être présents dans certaines conditions (Campbell, 2015b).

Noyau

Le noyau, de forme ronde à ovale chez la plupart des reptiles (chéloniens, serpents, crocodiles) et d'aspect lobé chez certains lézards, est positionné aux marges de la cellule et contient une chromatine très dense (*Figure 14*) (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

Cytoplasme

Le cytoplasme est clair voire transparent et contient des granules éosinophiles de couleur orange vif à rose. Ces granules sont fusiformes chez les chéloniens et les crocodiles tandis qu'ils sont davantage angulaires chez les squamates malgré leur caractère pléomorphe (Divers and Stahl, 2018). Il est important de noter que la taille et la coloration des granules cytoplasmiques des hétérophiles sont très variables et que l'on trouve parfois des hétérophiles dégranulés dans le sang des reptiles sains (Campbell, 2015b).

Lorsque des changements toxiques ont lieu au sein des hétérophiles, leurs cytoplasmes possèdent une basophilie accrue et contiennent des granules anormaux ainsi que des vacuoles (Campbell, 2015b). L'aspect des hétérophiles toxiques est détaillée dans la partie 2 II.C.5.f)(2)(a)(i).

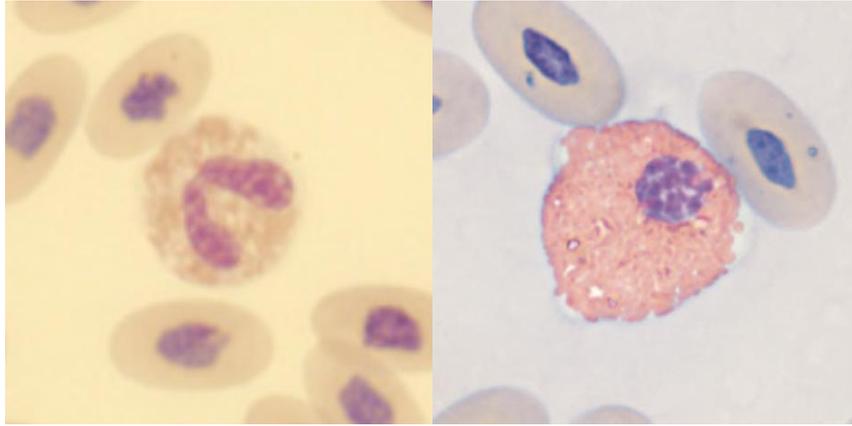


Figure 14 : à gauche, hétérophile sur un frottis sanguin d'iguane vert (*Iguana iguana*) -coloration de Wright-Giemsa. A droite, hétérophile sur un frottis sanguin d'un python birman (*Python molurus bivittatus*).- coloration de Wright (Campbell, 2015b)(Mader, 2006). Notez l'aspect lobé des noyaux des hétérophiles chez le lézard et l'aspect fusiforme des granules cytoplasmiques chez le serpent

(2) Éosinophiles

La morphologie des éosinophiles des reptiles est similaire à celle des mammifères hormis la présence de granules cytoplasmiques bleu-vert pâle chez certains lézards (*Figure 15*). Les éosinophiles sont rares ou absents chez la plupart des serpents mais ont été documentés chez certaines espèces comme le boa constrictor (Divers and Stahl, 2018).

Forme et taille

Les éosinophiles reptiliens sont de grandes cellules rondes de 9 à 20 μm de diamètre. La taille de cette cellule varie selon l'espèce : les serpents possèdent les plus grands éosinophiles et les lézards les plus petits (Campbell, 2015b). Chez les chéloniens, les éosinophiles mesurent de 11 à 17 μm de diamètre (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004).

Noyau

Le noyau est généralement situé au centre mais peut être légèrement excentrique. Tout comme le noyau des hétérophiles, celui des éosinophiles est rond à ovale mais peut être lobé chez certaines espèces de lézards (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

Cytoplasme

Le cytoplasme est bleu clair et contient un grand nombre de granules cytoplasmiques éosinophiles et sphériques (Campbell, 2015b). Chez certaines espèces de lézards comme les iguanes, les granules cytoplasmiques peuvent être de couleur bleu verte (Divers and Stahl, 2018).

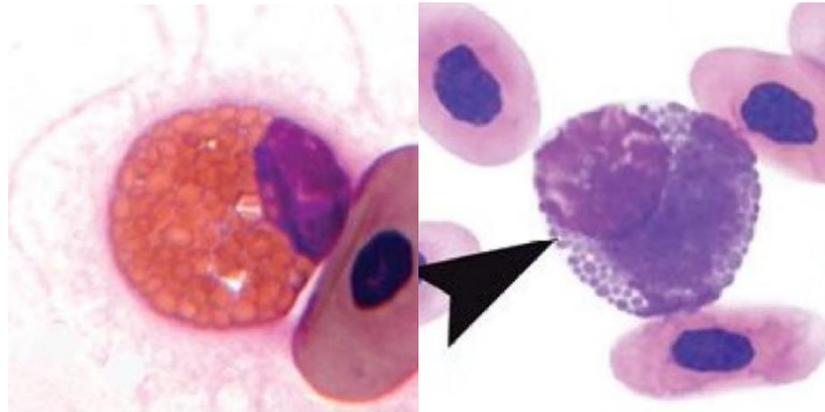


Figure 15 : éosinophile sur un frottis sanguin d'une tortue gaufree (*Gopherus agassizii*) à gauche et d'un iguane vert (*Iguana iguana*) à droite.- Coloration de Wright-Giemsa (Jacobson and Garner, 2020). Notez l'aspect sphériques des granules et la couleur bleue des granules chez l'iguane

(3) Basophiles

Les basophiles apparaissent plus fréquemment chez les chéloniens avec jusqu'à 40 % à 65 % des leucocytes chez certaines espèces.

Forme et taille

Les basophiles sont de petites cellules rondes mesurant 8 à 12 voire 15 μm de diamètre. Ils sont donc généralement plus petits que les hétérophiles et les éosinophiles au sein du frottis sanguin. La taille des basophiles est cependant très variable selon l'espèce : ceux des lézards ont tendance à être plus petits que ceux des tortues et des crocodiles (Campbell, 2015b).

Noyau

Le noyau est souvent obscurci par les granules, mais lorsqu'il est visible, ce dernier est rond et légèrement excentrique (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

Cytoplasme

Le cytoplasme est transparent à violet pâle et contient de nombreux granules cytoplasmiques ronds et basophiles bleu foncé à violet dits métachromatiques (*Figure 16*) (Divers and Stahl, 2018). Ainsi, le basophile est considéré par certains auteurs comme la petite cellule de «grappe de raisin» et est généralement facilement différenciée des autres granulocytes chez les reptiles (Divers and Stahl, 2018). Les basophiles peuvent dégranuler pour exposer leur noyau excentrique et leur cytoplasme violet pâle. Parfois, des granules sont observés à proximité de la cellule ou, plus rarement, l'expulsion des granules peut être évidente (*Figure 17*). Cette dégranulation des basophiles peut se produire dans de nombreuses situations tels que la coloration impliquant du méthanol, un prélèvement inapproprié ou encore un traitement tardif de l'échantillon (Divers and Stahl, 2018).

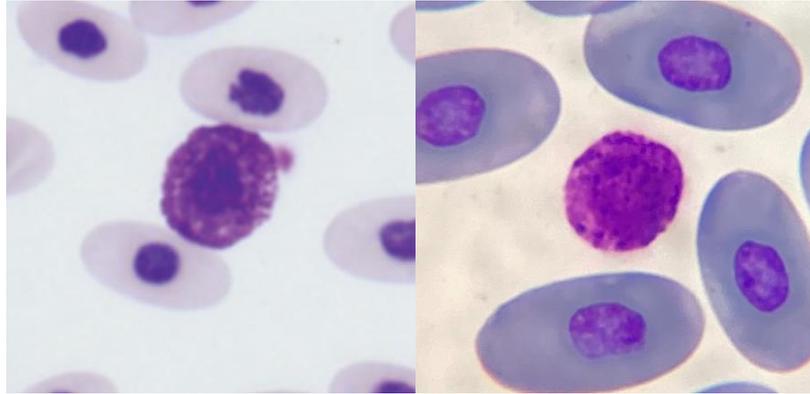


Figure 16 : à gauche, basophile chez un iguane vert (*Iguana iguana*).- coloration de Wright-Giemsa. A droite, basophile chez une tortue grecque (*Testudo graeca*) – coloration de May-Grünwald Giemsa (Campbell, 2015b)(Photographie personnelle)

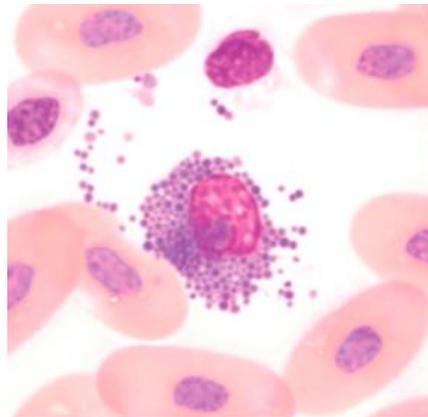


Figure 17 : granules libres d'un basophile rompu chez un varan des savanes (*Varanus exanthematicus*) – Coloration de Wright-Giemsa modifiée (Divers and Stahl, 2018)

(4) Lymphocytes

Les lymphocytes reptiliens ont une morphologie similaire à ceux des mammifères. Bien qu'il existe des exceptions, les lymphocytes sont les leucocytes les plus courants chez la plupart des reptiles sains, représentant jusqu'à 80 % du différentiel leucocytaire (Divers and Stahl, 2018). Le nombre de lymphocytes est influencé par de nombreux facteurs environnementaux et physiologiques tels que l'hibernation ou le sexe (partie 3 I.B) (Campbell, 2015b).

Forme et taille

Les lymphocytes sont des cellules rondes de 5 à 10 μm voire 15 μm de diamètre pour les cellules les plus grandes. D'après certains auteurs, les petits lymphocytes sont considérés comme des formes immatures de lymphocytes (Campbell, 2015a). La forme du lymphocyte est parfois irrégulière lorsqu'il touche d'autres cellules sur le frottis sanguin (Campbell and Ellis, 2007).

Noyau

Le noyau est central ou excentrique, rond à ovale et de grande taille. La chromatine, de couleur violet foncé à noire, est fortement condensée. Le lymphocyte possède un grand rapport nucléocytoplasmique (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

Chez les chéloniens, le noyau est habituellement non lobé mais il est parfois dentelé, y compris chez les animaux sains (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004).

Cytoplasme

Le cytoplasme est de petite taille, légèrement basophile et ne contient pas de granules.

Les lymphocytes réactifs peuvent être différenciés des lymphocytes normaux par la présence d'un cytoplasme plus abondant et profondément basophile (*Figure 18*). La chromatine nucléaire du lymphocyte réactif est également moins condensée (Campbell, 2015b). Ces cellules activées sont considérées comme des lymphocytes B impliqués dans la production d'immunoglobulines (Campbell, 2015a).

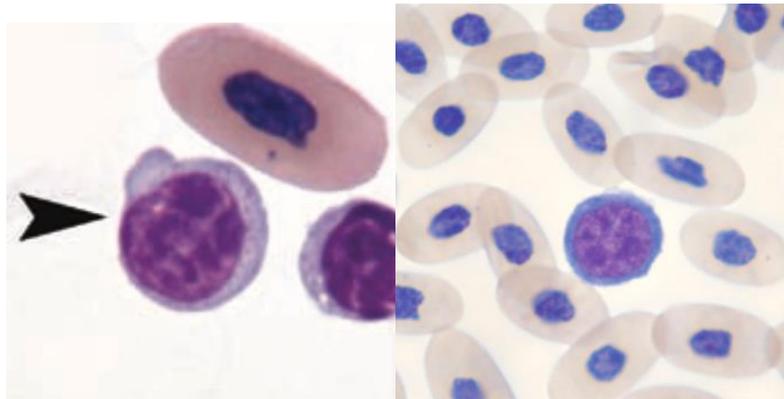


Figure 18 : à gauche, lymphocyte chez un varan du Pacifique (*Varanus indicus*), et à droite lymphocyte réactif chez un iguane vert (*Iguana iguana*) - Coloration de Wright-Giemsa (Jacobson, 2007) (Campbell, 2015b)

Les petits lymphocytes peuvent être difficiles à différencier des thrombocytes, il faut donc réaliser le différentiel avec précaution.

(5) Monocytes

Les monocytes reptiliens ressemblent à ceux des mammifères et sont généralement les plus gros leucocytes du sang périphérique des reptiles. Ainsi, ils sont souvent entraînés aux extrémités du frottis d'où l'importance d'examiner ces zones avec attention (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004).

Forme et taille

Les monocytes sont de forme ronde à ovale et mesurent 8 à 25 μm de diamètre (Divers and Stahl, 2018).

Noyau

Les monocytes contiennent un noyau de forme variable : il peut être rond, ovale ou lobé en forme de haricot (*Figure 19*). La chromatine nucléaire du monocyte est moins condensée et plus claire que celle des lymphocytes (Campbell, 2015b).

Cytoplasme

Le cytoplasme des monocytes est abondant, bleu-gris pâle et peut être légèrement opaque. Des vacuoles au contenu divers peuvent être présentes et contenir de la mélanine, des débris cellulaires, des lipides ou encore de l'hémossidérine (Divers and Stahl, 2018). Enfin, du matériel phagocyté et des granules azurophiles peuvent également être présents dans le cytoplasme de certains monocytes (Campbell, 2015b). Rappelons que l'azurophile, est parfois considéré dans la littérature comme un monocyte à granules azurophiles (Campbell, 2015b).

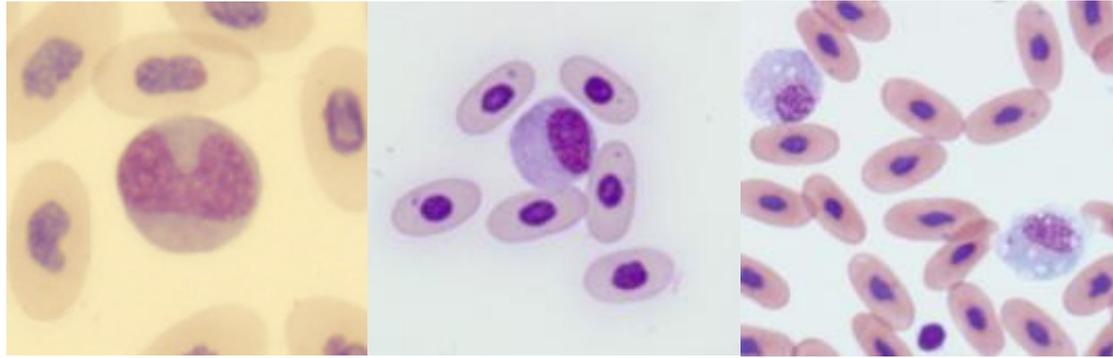


Figure 19 : à gauche, monocyte chez un iguane vert (*Iguana iguana*). Au milieu, monocyte chez une tortue (*Terrapene carolina triunguis*). A droite, monocytes chez un serpent (*Boa constrictor*) – Coloration de Wright-Giemsa (Campbell, 2015b). Notez les diverses formes possibles de noyau et la présence de vacuoles cytoplasmiques sur le frottis sanguin de ce boa

c) *Thrombocytes*

Avec l'âge, le nombre de thrombocytes a tendance à diminuer chez les reptiles (Divers and Stahl, 2018).

Forme et taille

Les thrombocytes sont plus petits que les érythrocytes. Ce sont des cellules ovales se transformant en cellules rondes et présentant parfois des pseudopodes lorsqu'elles sont activées (Campbell, 2015b). Ils mesurent de 8 à 16 μm de longueur et 5 à 9 μm de largeur (Divers and Stahl, 2018).

Noyau

Le noyau est ovale et central et il contient de la chromatine très dense de couleur violet foncé (*Figure 20*). Aucune structure interne n'y est visible (Divers and Stahl, 2018). Chez certaines espèces de chéloniens comme la tortue des steppes (*Testudo horsfieldi*), le noyau apparaît comme plié c'est à dire qu'une ligne pâle est observée au sein du noyau (*Figure 21*) (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004).

Cytoplasme

Les thrombocytes sont caractérisés par un petit cytoplasme incolore à bleu pâle, qui peut contenir quelques granules azurophiles (Campbell and Ellis, 2007).

Les thrombocytes activés sont courants et se présentent sous la forme d'agrégats de cellules de volume cytoplasmique réduit avec des membranes cytoplasmiques irrégulières et des vacuoles (Campbell, 2015b). Des pseudopodes et des filaments de type fibrine rayonnant entre et autour des cellules peuvent également être présents (Campbell, 2015b).

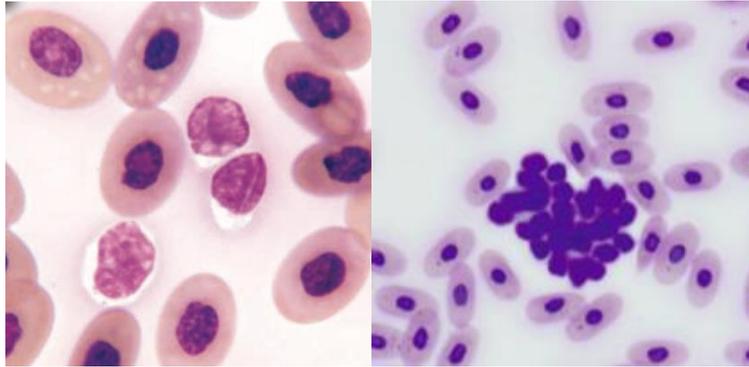


Figure 20 : à gauche, thrombocytes chez un iguane vert (*Iguana iguana*). A droite, agrégat de thrombocytes chez une tortue (*Terrapene carolina triunguis*) – Coloration de Wright-Giemsa (Jacobson, 2007)(Campbell, 2015b)

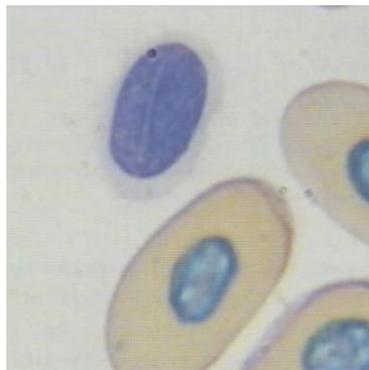


Figure 21 : thrombocyte parmi les érythrocytes chez une tortue des steppes (*Testudo horsfieldi*) (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004). Notez la présence de la fine ligne pâle au sein du noyau

Rappelons qu'il est parfois difficile de distinguer certains thrombocytes de petits lymphocytes (Figure 22), ce qui peut conduire à des erreurs dans le nombre total et le différentiel de leucocytes. Les différences incluent une forme plus ronde et un cytoplasme plus sombre des lymphocytes. La différenciation entre ces deux types cellulaires est plus facile avec les colorants de type Romanowsky, avec lesquels le cytoplasme des thrombocytes a tendance à rester incolore. Une différenciation évidente peut être faite grâce à la coloration PAS (Periodic Acid Schiff): les thrombocytes présentent généralement une coloration PAS positive tandis que les lymphocytes une coloration PAS négative (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

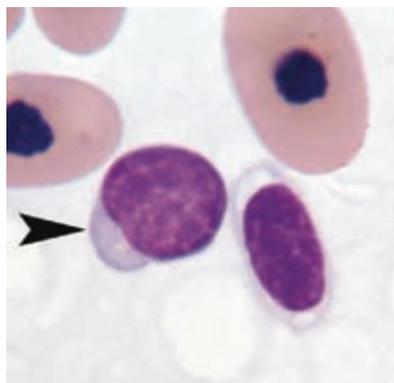
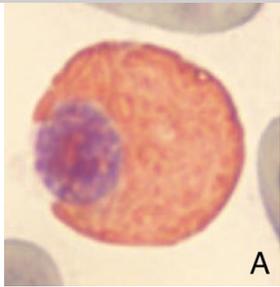
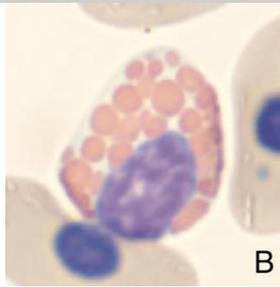
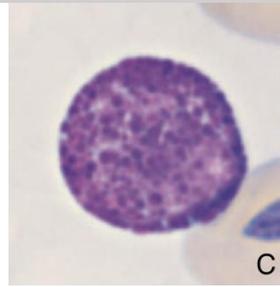
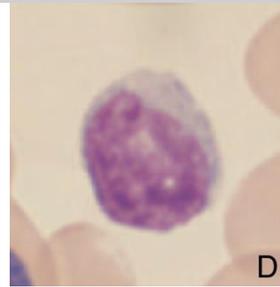
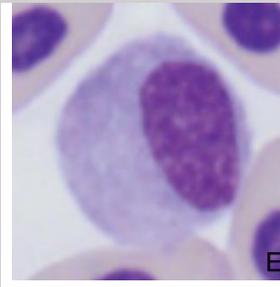
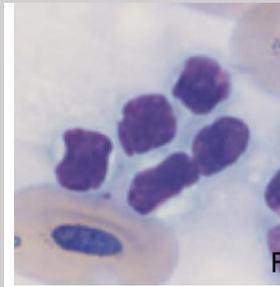


Figure 22 : lymphocyte (flèche) et thrombocyte chez un serpent (*Boa constrictor*) – coloration de Wright-Giemsa (Jacobson, 2007). Notez la forme plus ronde et l'aspect plus sombre du cytoplasme du lymphocyte

Les principales caractéristiques des cellules sanguines reptiliennes sont synthétisées ci-après (Tableau III).

Tableau III : récapitulatif des principales caractéristiques des cellules sanguines chez les reptiles (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013)(Campbell, 2015b)(Divers and Stahl, 2018)(Mader, 2006)

	Hétérophile	Éosinophile	Basophile	Lymphocyte	Monocyte	Thrombocyte
Aspect						
Taille	10-23 µm	9-20 µm	8-15 µm	5-15µm	8-25 µm	8-16 x 5-9 µm
Forme	Ronde aux bords parfois irréguliers +/- pseudopodes	Ronde	Ronde	Ronde	Ronde à ovale	Ovale Ronde +/- pseudopodes si activé
Noyau	Excentrique Rond à ovale (lobé chez certains lézards) Chromatine dense	Central ou excentrique Rond à ovale (lobé chez certains lézards)	Excentrique Rond Souvent obscurci par les granules	Central ou excentrique Ovale ou rond Grande taille Chromatine très condensée violet foncé à noir Grand rapport N/C	Rond, ovale, lobé (haricot) Chromatine moins condensée que lymphocyte	Central Ovale Chromatine très dense violet foncé
Cytoplasme	Transparent Granules éosinophiliques fusiformes chez chéloniens et squamates, angulaires chez squamates	Bleu clair Granules éosinophiliques sphériques (bleu/vert chez certains lézards)	Transparent à violet pâle Granules rondes basophiles bleu foncé à violet, métachromatiques	Petite taille Légèrement basophile (bleu pâle) Dépourvu de granules	Grande taille Bleu-gris pâle +/- vacuoles, matériel phagocyté et granules azurophiles	Petite taille Incolore à bleu pâle +/- granules azurophiles

A : hétérophile chez une tortue gaufree (*Gopherus agassizii*) – coloration de Wright

B : éosinophile chez une tortue de Floride (*Trachemys scripta elegans*) – coloration de Wright

C : basophile chez un python birman (*Python molurus bivittatus*) – coloration de Wright

D : lymphocyte chez un iguane vert (*Iguana iguana*) – coloration de Wright

E : monocyte chez une tortue boîte (*Terrapene carolina triunguis*) – coloration de Wright-Giemsa

F : thrombocytes chez un python birman (*Python molurus bivittatus*) – coloration de Wright

2. Caractéristiques morphologiques des cellules sanguines chez la tortue grecque

Les caractéristiques morphologiques des cellules sanguines ont été étudiées chez la tortue grecque au cours de quatre études publiées entre 2003 et 2015 (*Tableau IV*). Ces dernières s'intéressent aux dimensions des cellules sanguines chez la tortue grecque et tentent d'établir des références morphologiques afin de faciliter les analyses hématologiques. Dans l'étude de Kassab et al., les dimensions des cellules ont été mesurées en prenant en compte le sexe de la tortue afin d'étudier son influence sur la taille des cellules. Il s'est avéré que, hormis la largeur du noyau des érythrocytes, le sexe n'influçait pas les dimensions des cellules sanguines (Kassab, Shousha and Fargani, 2009).

Les résultats complets des dimensions cellulaires mesurées dans ces quatre études sont disponibles en annexe (*Annexes 1, 2, 3 et 4*).

Tableau IV : récapitulatif des études s'intéressant à la morphologie des cellules sanguines et leurs dimensions chez la tortue grecque (*Uğurtaş, Sevinç and Yildirimhan, 2003*) (*Tosunoglu, 2005*) (*Kassab, Shousha and Fargani, 2009*) (*Arikan et al., 2015*)

Nom de l'étude – auteurs - année	Nombre d'échantillons - site de prélèvement – coloration utilisée	Méthode de mesure - Nombre de cellules mesurées aléatoirement par individu	Paramètres étudiés		Remarques
Erythrocyte size and morphology of some tortoises and turtles from Turkey – Uğurtaş et al. – 2003	9 (5 femelles et 4 mâles) - Cœur (cardiocentèse) - Wright	Oculaire micrométrique 50 érythrocytes Soit 450 érythrocytes mesurés au total	Mesures cellulaires	Érythrocytes : L, l, t, Lnoyau, Inoyau, tnoyau, rapport nucléocytoplasmique	Aucune différence significative entre les sexes donc groupement des données Détails des mesures en Annexe 1
			Description morphologique	Érythrocytes	
Hematological values in Hermann's tortoise (<i>Testudo hermanni</i>) and spur-thighed tortoise (<i>Testudo graeca</i>) from Thrace region (Turkey) – Tosunoglu et al. - 2005	7 (sexes inconnus) - Cœur (cardiocentèse) - Wright	Oculaire micrométrique 40 érythrocytes 20 lymphocytes, monocytes, éosinophiles et thrombocytes 10 basophiles Soit 280 érythrocytes, 140 lymphocytes, monocytes, éosinophiles, thrombocytes et 70 basophiles mesurés au total	Mesures cellulaires	Érythrocytes : L, l, t, Lnoyau, Inoyau, tnoyau, rapport nucléocytoplasmique, rapport L/l érythrocytes, rapport L/l noyau	Aucune différence significative entre les sexes donc groupement des données Détails des mesures en Annexe 2
			Description morphologique	Éosinophiles : diamètre	
				Basophiles : diamètre	
				Lymphocytes : diamètre des grands et petits lymphocytes	
				Monocytes : diamètre	
				Thrombocytes : L, l	
			Érythrocytes		

Morphology of blood cells, liver and spleen of the desert tortoise – Kassab et al. - 2009	40 (20 femelles et 20 mâles) - Cœur (cardiocentèse) - Wright	Oculaire micrométrique 100 érythrocytes 30 lymphocytes, monocytes, éosinophiles, hétérophiles, basophiles et thrombocytes Soit 4000 érythrocytes et 1200 lymphocytes, monocytes, éosinophiles, hétérophiles, basophiles et thrombocytes mesurés au total	Mesures cellulaires	Érythrocytes en fonction du sexe L, l, t, Lnoyau, Inoyau	Différence significative entre les sexes observée seulement pour la largeur du noyau des érythrocytes (moyenne chez femelles : 4,472 µm, ; moyenne chez les mâles : 4,7940µm). Détails des mesures en Annexe 3
				Hétérophiles en fonction du sexe : L, l, t	
				Éosinophiles en fonction du sexe : L, l, t	
				Basophiles en fonction du sexe : L, l, t	
				Lymphocytes en fonction du sexe : L, l, t	
				Monocytes en fonction du sexe : L, l, t	
			Thrombocytes en fonction du sexe : L, l, t		
Description morphologique	Tous les types cellulaires				
Bloods cells morphology of Testudo graeca and Testudo hermanni from Turkey - Arikan et al. - 2015	9 (4 femelles et 5 mâles) – Veine caudale - Wright	Oculaire micrométrique 40 érythrocytes Non précisé pour les autres types cellulaires Soit 360 érythrocytes mesurés au total	Mesures cellulaires	Érythrocytes : L, l, t, Lnoyau, Inoyau, rapport nucléocytoplasmique	Détails des mesures en Annexe 4
				Hétérophiles : diamètre	
				Éosinophiles : diamètre	
				Basophiles : diamètre	
				Lymphocytes : diamètre des grands et petits lymphocytes	
				Monocytes : diamètre	
			Thrombocytes : L, l, Lnoyau, Inoyau,		
Description morphologique	Tous les types cellulaires mais <i>T. graeca</i> et <i>T. hermanni</i> confondus				

L : longueur de la cellule, *l* : largeur de la cellule, *t* : taille de la cellule, *Lnoyau* : longueur du noyau, *Inoyau* : largeur du noyau, *rapport L/l* : rapport longueur sur largeur de la cellule, *rapport L/l noyau* : rapport longueur sur largeur du noyau

a) Érythrocytes

Les érythrocytes de *Testudo graeca* sont des cellules ellipsoïdes.

Le noyau des érythrocytes est ovale et situé au centre de la cellule comme chez les autres espèces de reptiles. Il est de couleur violet foncé en coloration de Wright (*Figure 23*).

Le cytoplasme des érythrocytes est de couleur rose homogène en coloration de Wright. Certains auteurs décrivent une coloration cytoplasmique rose à jaunâtre (Arikan *et al.*, 2015). Le cytoplasme peut contenir des vacuoles proéminentes (Kassab, Shousha and Fargani, 2009).

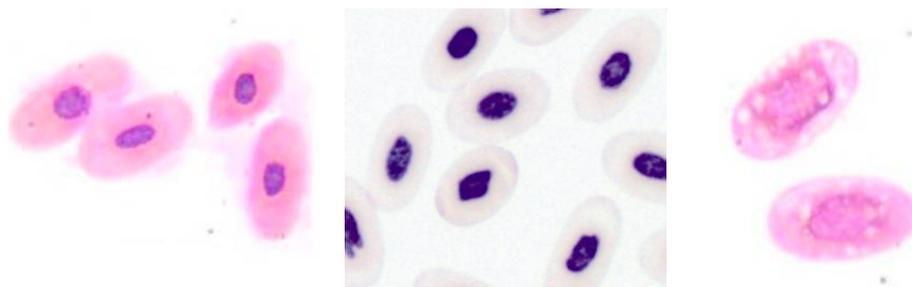


Figure 23 : érythrocytes à gauche et au milieu, et érythrocytes contenant des vacuoles chez une tortue grecque à droite – coloration de Wright (Kassab, Shousha and Fargani, 2009)(Arikan *et al.*, 2015)

Les dimensions des érythrocytes et de leurs noyaux ont été mesurées chez la tortue grecque au cours des quatre études citées précédemment (*Tableau V*).

Tableau V : récapitulatif des dimensions cellulaires et de la taille des érythrocytes d'après quatre études menées chez la tortue grecque (Uğurtaş, Sevinç and Yildirimhan, 2003)(Tosunoglu, 2005)(Kassab, Shousha and Fargani, 2009)(Arikan *et al.*, 2015)

Paramètre	Uğurtaş et al.		Tosunoglu et al.		Kassab et al.				Arikan et al.	
	Sexes confondus		Sexes confondus		Mâles		Femelles		Sexes confondus	
	Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD
Longueur (µm)	18,29	0,76	17,93	0,96	18,77	2,81	19,19	2,90	17,5	2,07
Largeur (µm)	11,35	0,54	9,86	0,42	9,53	2,23	9,84	2,51	11,8	1,59
Taille (µm²)	163,00	11,84	139,38	13,48	140,42	49,35	142,08	54,99	163,1	33,76
Longueur noyau (µm)	7,34	0,56	5,67	0,25	6,14	0,82	6,32	0,82	6,1	0,75
Largeur noyau (µm)	4,96	0,54	3,44	0,34	4,45*	0,89	4,79*	0,89	4,9	0,22
Taille noyau (µm²)	28,60	3,73	15,54	2,02	/	/	/	/	23,2	4,83
Rapport nucléocytoplasmique	0,17	0,02	0,11	/	/	/	/	/	0,1	0,04

b) Hétérophiles

Dans les études descriptives des cellules sanguines, les hétérophiles sont décrits comme les leucocytes les plus abondants dans le sang des individus prélevés.

Les hétérophiles contiennent de grands granules cytoplasmiques éosinophiles et ovoïdes ainsi qu'un noyau excentrique et basophile avec une chromatine dense (Kassab, Shousha and Fargani, 2009). Certains auteurs décrivent le noyau comme bilobé (Arikan *et al.*, 2015). Le cytoplasme peut être difficile à visualiser et est de couleur transparente à bleu clair.

Cependant, les granules cytoplasmiques décrits dans la littérature comme ovoïdes en coloration de Wright chez la tortue grecque ont été aperçus comme fusiformes lors d'observations personnelles en coloration de May-Grünwald Giemsa (*Figure 24*). Cette constatation est d'ailleurs en adéquation avec les données descriptives des hétérophiles retrouvées dans la littérature chez les chéloniens. Cette variation de forme des granules cytoplasmiques pourrait être expliquée par l'usage de colorants différents ou par le fait que les sous-espèces étudiées soient différentes entre l'étude de Kassab et al. et les travaux personnels.

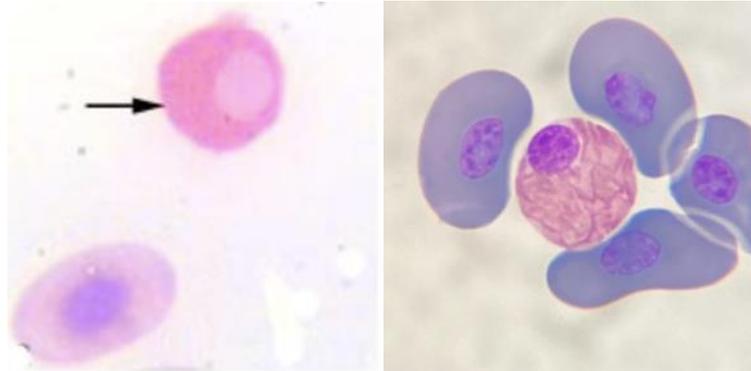


Figure 24 : hétérophile chez une tortue grecque – coloration de Wright à gauche et coloration de May-Grünwald Giemsa à droite (Kassab, Shousha and Fargani, 2009)(photographie personnelle)

Deux études s'intéressent aux dimensions des hétérophiles chez les tortues grecques (*Tableau VI*).

Tableau VI : récapitulatif des dimensions cellulaires et de la taille des hétérophiles d'après deux études menées chez la tortue grecque (Kassab, Shousha and Fargani, 2009)(Arikan et al., 2015)

Paramètre	Kassab et al.				Arikan et al.	
	Mâles		Femelles		Sexes confondus	
	Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD
Longueur (µm)	15,53	2,73	15,49	2,52	/	/
Largeur (µm)	13,49	2,61	12,88	2,54	/	/
Taille (µm²)	172,72	58,60	167,06	49,24	/	/
Diamètre (µm)	/	/	/	/	9,8	0,35

c) *Éosinophiles*

Le granulocyte éosinophile est une cellule ronde. Il se reconnaît par ses granules cytoplasmiques éosinophiles ronds qui ne comblent pas le cytoplasme légèrement jaunâtre (*Figure 25*). Le noyau est excentrique, rond à ovale, simple ou bilobé et parfois masqué par les granules (Arikan *et al.*, 2015). Il contient de la chromatine agglomérée et colorée en rouge (Kassab, Shousha and Fargani, 2009).

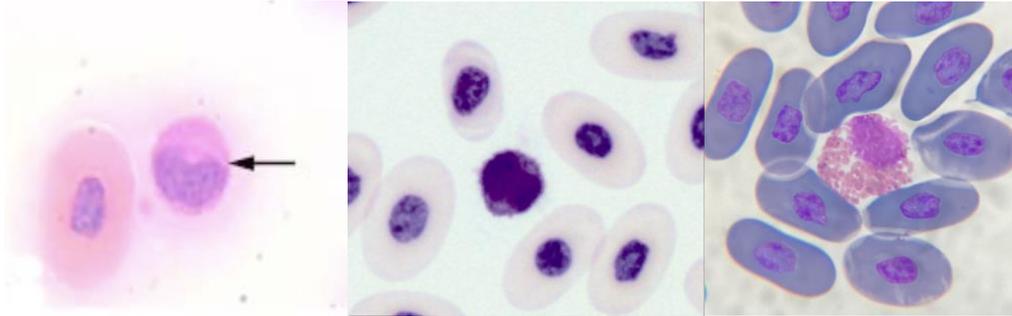


Figure 25 : éosinophiles chez une tortue grecque – coloration de Wright à gauche et au milieu, coloration de May-Grünwald Giemsa à droite (Kassab, Shousha and Fargani, 2009)(Arikan et al., 2015)(photographie personnelle)

Trois études s'intéressent aux dimensions des éosinophiles chez la tortue grecque (*Tableau VII*).

Tableau VII : récapitulatif des dimensions cellulaires et de la taille des éosinophiles d'après trois études menées chez la tortue grecque (Tosunoglu, 2005)(Kassab, Shousha and Fargani, 2009)(Arikan et al., 2015)

Paramètre	Tosunoglu et al.		Kassab et al.				Arikan et al.	
	Sexes confondus		Mâles		Femelles		Sexes confondus	
	Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD
Longueur (µm)	/	/	14,49	1,54	14,20	1,81	/	/
Largeur (µm)	/	/	10,73	1,71	10,09	1,31	/	/
Taille (µm ²)	/	/	122,84	26,24	118,34	28,72	/	/
Diamètre (µm)	12,17	0,96	/	/	/	/	12,5	1,06

d) Basophiles

Le basophile est un granulocyte de forme ronde. Il est facilement identifiable grâce à ses grands granules ronds et violets, profondément colorés et étroitement collés au noyau central (*Figure 26*). Dans certains cas, les granules peuvent complètement recouvrir le noyau (Arikan *et al.*, 2015)(Kassab, Shousha and Fargani, 2009).

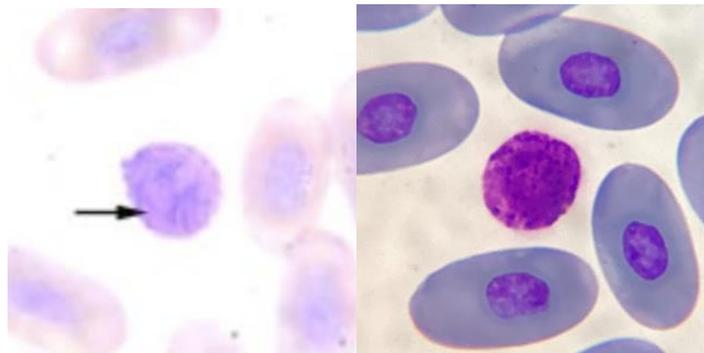


Figure 26 : basophiles chez une tortue grecque – coloration de Wright à gauche et coloration de May-Grünwald Giemsa à droite (Kassab, Shousha and Fargani, 2009)(photographie personnelle)

Les trois études utilisées précédemment comme bases de données s'intéressent également aux dimensions des basophiles chez les tortues grecques (*Tableau VIII*).

Tableau VIII : récapitulatif des dimensions cellulaires et de la taille des basophiles d'après trois études menées chez la tortue grecque (Tosunoglu, 2005)(Kassab, Shousha and Fargani, 2009)(Arikan et al., 2015)

Paramètre	Tosunoglu et al.		Kassab et al.				Arikan et al.	
	Sexes confondus		Mâles		Femelles		Sexes confondus	
	Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD
Longueur (µm)	/	/	12,19	1,02	12,56	1,15	/	/
Largeur (µm)	/	/	11,91	0,98	12,27	1,19	/	/
Taille (µm ²)	/	/	114,90	18,83	121,99	22,06	/	/
Diamètre (µm)	9,10	0,63	/	/	/	/	10,9	0,42

e) *Lymphocytes*

Les lymphocytes sont plus sphéroïdes que les thrombocytes. Le cytoplasme des lymphocytes est coloré en bleu et est de petite taille : le rapport nucléocytoplasmique est donc supérieur à 1 (*Figure 27*). Le noyau est rond et contient un fin motif réticulaire (Kassab, Shousha and Fargani, 2009).

L'étude de Arikan et al. souligne l'observation de petits et de grands lymphocytes. Le noyau est décrit comme sphérique et intensément coloré quelle que soit la taille des cellules mais à la différence des grands lymphocytes, le noyau occupe presque tout le cytoplasme chez les petits lymphocytes (Arikan *et al.*, 2015).

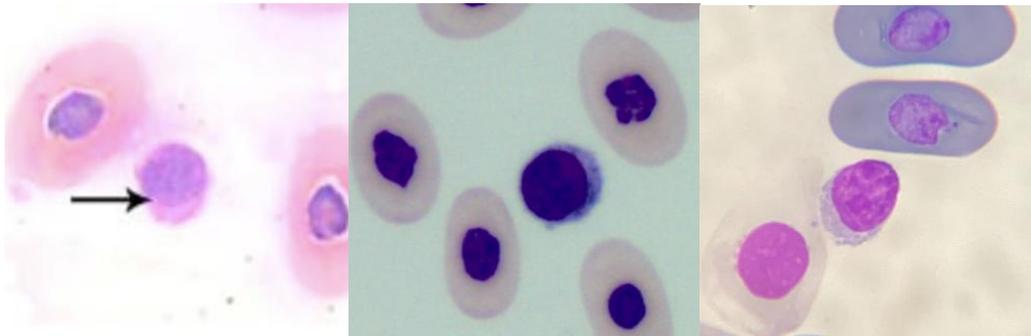


Figure 27 : lymphocytes chez une tortue grecque – coloration de Wright à gauche et au milieu et coloration de May-Grünwald Giemsa à droite (Kassab, Shousha and Fargani, 2009)(Arikan et al., 2015)(photographie personnelle)

Les trois études utilisées précédemment comme bases de données s'intéressent également aux dimensions des lymphocytes chez les tortues grecques (*Tableau IX*).

Tableau IX : récapitulatif des dimensions cellulaires et de la taille des lymphocytes d'après trois études menées chez la tortue grecque (Tosunoglu, 2005)(Kassab, Shousha and Fargani, 2009)(Arikan et al., 2015)

Paramètre		Tosunoglu et al.		Kassab et al.				Arikan et al.	
		Sexes confondus		Mâles		Femelles		Sexes confondus	
		Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD
Longueur (µm)		/	/	9,16	2,18	10,10	2,44	/	/
Largeur (µm)		/	/	7,70	1,78	8,71	2,16	/	/
Taille (µm ²)		/	/	58,15	27,21	73,05	32,08	/	/
Diamètre (µm)	Grand lymphocyte	11,28	0,85	/	/	/	/	12,1	0,80
	Petit lymphocyte	7,80	0,24	/	/	/	/	9,1	0,68

f) *Monocytes*

Les monocytes contiennent un grand cytoplasme de couleur bleu-gris clair, finement granuleux ou vacuolé et un noyau ovale ou lobé avec une chromatine dense de couleur violet foncé (*Figure 28*) (Kassab, Shousha and Fargani, 2009).

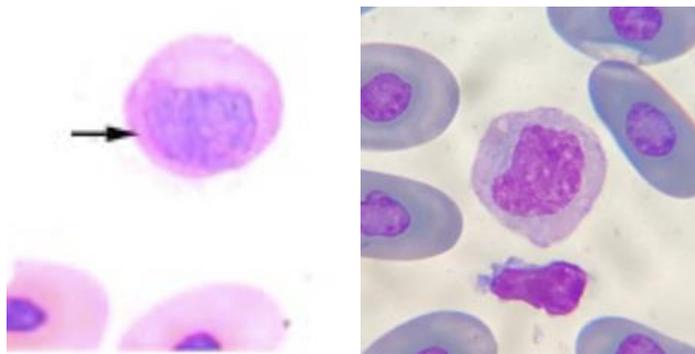


Figure 28 : monocytes chez une tortue grecque – coloration de Wright à gauche et coloration de May-Grünwald Giemsa à droite (Kassab, Shousha and Fargani, 2009)(photographie personnelle)

Les dimensions des monocytes ont également été décrites chez les tortues grecques dans les trois études citées précédemment (*Tableau X*).

Tableau X : récapitulatif des dimensions cellulaires et de la taille des monocytes d'après trois études menées chez la tortue grecque (Tosunoglu, 2005)(Kassab, Shousha and Fargani, 2009)(Arikan et al., 2015)

Paramètre		Tosunoglu et al.		Kassab et al.				Arikan et al.	
		Sexes confondus		Mâles		Femelles		Sexes confondus	
		Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD
Longueur (µm)		/	/	14,67	2,54	14,99	2,84	/	/
Largeur (µm)		/	/	10,28	2,06	10,92	1,94	/	/
Taille (µm ²)		/	/	118,32	49,35	125,75	59,98	/	/
Diamètre (µm)		13,37	1,17	/	/	/	/	12,0	0,59

g) *Thrombocytes*

Les thrombocytes sont de petites cellules ovales au cytoplasme clair et contenant un noyau rond, densément coloré et remplissant presque tout le cytoplasme (Arikan *et al.*, 2015)(Kassab, Shousha and Fargani, 2009). Comme chez les autres reptiles, ces cellules sont souvent agglutinées entre elles chez les tortues grecques. Il est souvent difficile de différencier les thrombocytes des lymphocytes : la clarté du cytoplasme et la capacité des thrombocytes à former des amas sont deux critères permettant de les identifier (*Figure 29*) (Kassab, Shousha and Fargani, 2009).

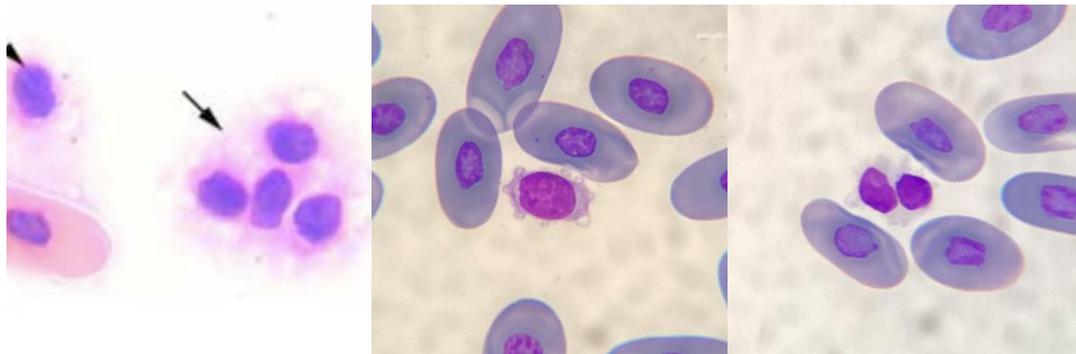


Figure 29 : thrombocytes chez une tortue grecque– coloration de Wright à gauche et coloration de May-Grünwald Giemsa au milieu et à droite (Kassab, Shousha and Fargani, 2009)(photographies personnelles)

Les trois études utilisées précédemment comme bases de données ont également mesuré les dimensions des thrombocytes chez les tortues grecques (*Tableau XI*).

Tableau XI : récapitulatif des dimensions cellulaires et de la taille des thrombocytes d’après trois études menées chez la tortue grecque (Tosunoglu, 2005)(Kassab, Shousha and Fargani, 2009)(Arikan *et al.*, 2015)

Paramètre	Tosunoglu <i>et al.</i>		Kassab <i>et al.</i>				Arikan <i>et al.</i>	
	Sexes confondus		Mâles		Femelles		Sexes confondus	
	Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD
Longueur (µm)	8,92	0,79	6,19	0,93	6,29	1,01	12,6	0,79
Largeur (µm)	4,81	0,51	4,59	0,96	4,62	1,03	7,4	0,74
Taille (µm²)	/	/	22,70	7,14	23,22	7,60	/	/
Longueur noyau (µm)	/	/	/	/	/	/	9,0	0,45
Largeur noyau (µm)	/	/	/	/	/	/	7,2	0,74

Chez la tortue grecque, les érythrocytes sont des cellules ellipsoïdes au noyau ovale et central. Les hétérophiles contiennent de grands granules cytoplasmiques éosinophiles et ovoïdes, ainsi qu'un noyau excentrique. Les éosinophiles possèdent eux aussi des granules cytoplasmiques éosinophiles ronds et leur noyau est excentrique, rond à ovale et simple ou bilobé. Les basophiles sont plus facilement identifiables grâce à leurs grands granules ronds et violets foncés étroitement collés au noyau central. Les lymphocytes contiennent un cytoplasme de petite taille de couleur bleue et un noyau rond au motif réticulaire. Les monocytes possèdent quant à eux un grand cytoplasme bleu à gris clair, finement granuleux ou vacuolé, et un noyau ovale. Enfin, les thrombocytes sont des cellules ovales formant fréquemment des amas et contenant un grand noyau rond et très coloré.

II. La numération formule sanguine chez la tortue terrestre

A. Paramètres hématologiques quantitatifs

1. Lignée rouge

a) *PCV/Ht*

Le Packed Cell Volume, exprimé en pourcentage, est la mesure physique de la proportion du volume sanguin occupé par les érythrocytes. Il est souvent confondu avec l'hématocrite, mais une distinction est nécessaire car le PCV correspond à la mesure physique du pourcentage de globules rouges alors que l'hématocrite est une valeur calculée (Chitty and Raftery, 2013).

Le PCV est souvent le paramètre de la lignée rouge permettant d'évaluer au mieux l'état clinique des reptiles.

b) *RBC*

Le Red Blood Cell est le nombre total d'érythrocytes contenus dans un volume de sang déterminé. Il s'exprime classiquement en nombre d'érythrocytes par litre.

c) *Hb*

Il s'agit de la concentration en hémoglobine du sang, c'est à dire la quantité moyenne d'hémoglobine dans un litre de sang. Elle s'exprime en gramme par décilitre (g/dL).

d) *MCV, MCH, MCHC* :

Ce sont des indices érythrocytaires, calculés secondairement à partir du PCV, du nombre total d'érythrocytes et de la concentration en hémoglobine.

Le Mean Cell Volume MCV (appelé Volume Globulaire Moyen VGM) correspond au volume moyen d'un globule rouge. Il est classiquement exprimé en femtolitres (fL).

Le Mean Corpuscular Hemoglobin MCH (appelé Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine TCMH) correspond à la quantité moyenne d'hémoglobine contenue dans un érythrocyte. Il s'exprime en picogramme (pg).

Le Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration MCHC (appelé Concentration Globulaire Moyenne en Hémoglobine CGMH) correspond à la concentration moyenne en hémoglobine dans un érythrocyte. Il s'exprime en gramme par décilitre (g/dL).

Ainsi, ces indices sont calculés grâce aux formules suivantes (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013) :

$$\begin{aligned} \text{MCV (fL)} &= \frac{\text{PCV}(\%)}{\text{RBC}} \times 10 \\ \text{MCH (pg)} &= \frac{\text{Hb} \left(\frac{\text{g}}{\text{dL}}\right)}{\text{RBC}} \times 10 \\ \text{MCHC} \left(\frac{\text{g}}{\text{dL}}\right) &= \frac{\text{Hb} \left(\frac{\text{g}}{\text{dL}}\right)}{\text{PCV}(\%)} \times 100 \end{aligned}$$

Il existe des valeurs de référence pour ces indices mais la survenue de valeurs anormales n'est que très peu interprétée chez les reptiles (Campbell and Ellis, 2007). Cependant, ces indices peuvent se révéler utiles pour caractériser une anémie (partie 3 II.A.1) bien qu'elle soit généralement de type normocytaire et normochrome chez les reptiles (Saggese, 2009).

Enfin, malgré le fait que le nombre total d'érythrocytes soit très variable selon l'espèce de reptile, les indices érythrocytaires sont relativement similaires entre les espèces (Divers and Stahl, 2018).

e) *Nombre de réticulocytes*

Le réticulocyte est le dernier stade avant l'obtention d'érythrocyte mature. La détermination de la proportion de réticulocytes parmi la population érythrocytaire permet d'analyser le caractère régénératif d'une anémie.

2. Lignée blanche et WBC

Le White Blood Cell est le nombre total de leucocytes contenus dans un volume de sang déterminé. Il s'exprime classiquement en nombre de leucocytes par litre ou microlitre.

L'évaluation de lignée blanche chez les reptiles requiert la détermination du WBC mais également du différentiel leucocytaire et d'un examen morphologique des leucocytes au frottis (partie 2 II.C).

3. Thrombocytes et TTC

Le Total Thrombocyte Count est le nombre total de thrombocytes contenus dans un volume de sang déterminé. Il s'exprime classiquement en nombre de thrombocytes par microlitre.

B. Prélèvement sanguin chez la tortue terrestre

1. Volume sanguin collecté

Les reptiles possèdent un volume sanguin inférieur aux mammifères de même taille. En effet, le volume total de sang chez les reptiles varie entre 5 et 8 % du poids vif selon les espèces. La plupart des reptiles tolèrent une perte de 10 % du volume sanguin total (Sykes and Klaphake, 2015). Ainsi, la majorité des chercheurs recommandent un prélèvement sanguin ne dépassant pas 0,5 à 0,8 % du poids vif. Selon d'autres auteurs, la ponction sanguine peut atteindre 1 % du poids vif sans répercussion sur la santé de l'animal (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

Chez les individus stressés, il est recommandé de diminuer ce volume car le stress induit un changement de répartition des fluides cellulaires à l'origine d'une diminution du volume sanguin (Redrobe and MacDonald, 1999). L'activité locomotrice provoque également une translocation vasculaire à l'origine d'une réduction du volume sanguin atteignant les 21 % chez certaines espèces de serpent (Lillywhite and Smits, 1984). L'effet de l'activité sur la redistribution sanguine chez les reptiles dépasse largement celui observé chez les mammifères, il conviendra donc d'y prêter une attention particulière.

En pratique, le prélèvement de sang chez la tortue peut atteindre 3 ml/kg chez des individus en bonne santé. Il conviendra de réduire ce volume chez les animaux malades (Chitty and Raftery, 2013). Il est par ailleurs important de calculer précisément ce volume avant d'effectuer le prélèvement car le poids d'une tortue fréquemment surestimé.

2. Matériel et choix de l'anticoagulant

a) Matériel de prélèvement

Afin de réaliser le prélèvement sanguin, on utilise une aiguille stérile montée sur une seringue adaptée au volume souhaité et donc au poids de la tortue. Le choix de l'aiguille doit également être adapté à la taille de la tortue prélevée : des aiguilles de 25 à 26 G sont conseillées pour de petites tortues tandis que des aiguilles de 21 à 23 G sont préférées pour de grands individus (Le Net, 2015).

Pour préserver l'intégrité cellulaire, il est recommandé d'utiliser une aiguille du plus grand calibre possible associée à une petite seringue afin de permettre au sang de s'écouler tout en minimisant la pression aspirative (Divers and Stahl, 2018).

Un cathéter peut également être utilisé notamment lors de prélèvement à la veine jugulaire. Il conviendra de collecter les gouttes de sang directement dans le tube au fur et à mesure que celles-ci s'écoulent (Redrobe and MacDonald, 1999)(Jacobson, Schumacher and Green, 1992).

L'usage de seringue et d'aiguille pré-enduites d'anticoagulant comme l'héparine est inutile et est à l'origine d'artéfact de dilution (Divers and Stahl, 2018).

b) Choix de l'anticoagulant

Les frottis sont réalisés directement à partir de sang frais puis le reste du sang est placé dans un tube contenant l'anticoagulant après démontage de l'aiguille.

Contrairement à ce qui est utilisé chez les mammifères, l'EDTA n'est pas l'anticoagulant de choix pour l'évaluation hématologique chez tous les reptiles. Il est en effet adapté pour l'évaluation du nombre et de la morphologie des leucocytes chez les lézards et les serpents, mais il provoque une hémolyse chez certaines espèces de reptiles et notamment chez les chéloniens (Campbell, 2014). Ainsi, l'utilisation d'un tube hépariné lors de prélèvement sanguin chez les reptiles est largement répandue. Cependant, l'héparine est parfois à l'origine d'agglomérat de leucocytes et de thrombocytes ainsi que d'une teinte bleutée diffuse du frottis (*Figure 30*) ce qui complique l'évaluation morphologique et quantitative des cellules (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013). Si un tube hépariné est utilisé, il conviendra donc de réaliser les analyses hématologiques aussi rapidement que possible pour limiter ces artéfacts.

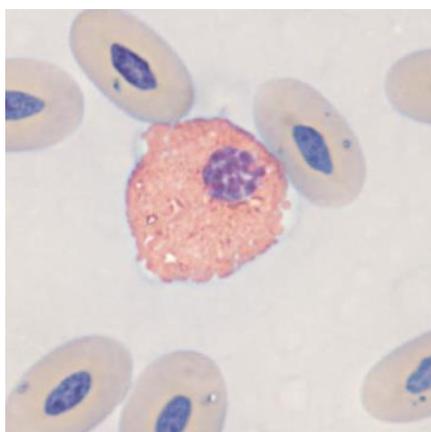


Figure 30 : frottis sanguin de python (*Python molurus bivittatus*) réalisé à partir de sang collecté dans un tube hépariné (Mader, 2006). Notez la teinte bleutée du fond de frottis sanguin due à l'héparine

L'utilisation de tube citraté est controversée. Certains auteurs la déconseillent car elle serait à l'origine de lyse cellulaire tandis que d'autres la recommandent (Campbell, 2014).

Il apparaît donc qu'il n'y a pas de recommandation unique quant au choix des anticoagulants chez les reptiles, d'autant plus que les réactions cellulaires qu'ils induisent sont spécifiques à certaines espèces (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

Le recensement actuel des études s'intéressant au choix de l'anticoagulant chez les reptiles est disponible ci-dessous (*Tableau XII*).

Tableau XII : synthèse de quelques études menées chez les reptiles et évaluant l'impact des anticoagulants sur la qualité des analyses sanguines (Divers and Stahl, 2018)(Christopher S. Hanley et al., 2004)

Anticoagulants étudiés	Espèce	Anticoagulant préféré si comparaison	Paramètres étudiés et observations
EDTA et héparine	<i>Testudo hermanni</i> (tortue terrestre)	Héparine	Hémolyse en 6 heures avec l'EDTA. Absence de lyse avec l'héparine
	<i>Apalone spinifera</i> (tortue d'eau douce)	Héparine	Hémolyse pour tous les prélèvements sur EDTA
	<i>Graptemys flavimaculata</i> (tortue d'eau douce)	EDTA	
	<i>Iguana iguana</i> (iguane)	EDTA	Thrombocytes, WBC, hétérophiles et monocytes comptés plus en accord avec les proportions du frottis sanguin avec EDTA qu'avec l'héparine
	<i>Python bivittatus</i> (serpent)	Pas de différence	
EDTA	<i>Alligator mississippiensis</i> (crocodilien)	/	Utilisé sans problème apparent pour la détermination des paramètres hématologiques
	<i>Pantherophis obsoleta quadrivittata</i> (serpent)	/	Résultats acceptables pour l'évaluation de la morphologie cellulaire

L'influence des anticoagulants sur la qualité des analyses hématologiques n'a pas été étudiée chez la tortue grecque. Cependant, de nombreux auteurs recommandent l'utilisation d'héparine chez les chéloniens car l'hémolyse est très fréquente lors de l'utilisation d'EDTA (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004). D'après certains auteurs, pour les espèces de reptiles chez lesquelles aucune étude de comparaison des anticoagulants n'a été menée, l'héparine de lithium doit être considérée comme l'anticoagulant de choix (Divers and Stahl, 2018).

Finalement, si le prélèvement est envoyé au laboratoire, il est nécessaire de prendre connaissance de l'anticoagulant requis car celui-ci varie selon les préférences du laboratoire et l'expérience de l'hématologiste.

3. Contention et site de prélèvement

a) *Considérations générales*

Il existe de nombreux sites de prélèvement sanguin chez la tortue. Le but est de réaliser une prise de sang rapide, sécuritaire et la moins invasive possible. De nombreux paramètres sont donc à prendre en compte lors du choix du site de ponction veineuse (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013) :

- La taille de la tortue

Le prélèvement au sinus sub-carapacial permet l'obtention d'échantillon même chez les plus petits individus.

- Le volume sanguin requis

Certains sites comme la veine jugulaire ou le sinus sub-carapacial permettent l'obtention d'un grand volume sanguin, contrairement à la veine caudale dorsale par exemple.

- Le tempérament de la tortue

Le prélèvement au niveau de la veine jugulaire ou du sinus veineux occipital nécessite la préhension de la tête de l'animal ce qui peut s'avérer difficile et dangereux chez les animaux agressifs.

- L'expérience du clinicien et ses connaissances anatomiques

Les prélèvements sanguins se réalisent souvent à l'aveugle. L'expérience et les connaissances anatomiques de l'opérateur sont donc primordiales pour la réussite du prélèvement et la sécurité de l'animal.

- Le risque de lymphodilution (partie 2 II.B.3.e)

Chez les reptiles, le trajet des vaisseaux lymphatiques suit fréquemment celui des vaisseaux sanguins. En conséquence, une ponction de lymphe est possible lors de la ponction veineuse et est à l'origine d'une hémodylution qui fausse les analyses hématologiques. Certains sites de prélèvement comme le sinus sub-carapacial présentent un risque accru de lymphodilution même si tous les sites de ponction veineuse sont concernés par cet aléa.

b) *Contention et sédation*

Comme chez de nombreux animaux, la prise de sang est une opération relativement invasive à l'origine de douleur chez la tortue. Une infection provoquée par la ponction veineuse peut également survenir. Pour limiter ces effets néfastes, une asepsie méticuleuse et une contention fiable sont requises.

Pour garantir la sécurité de l'animal mais également celle du clinicien, il est parfois nécessaire de réaliser une sédation chez les animaux agressifs ou chez les individus de grande taille. De nombreux protocoles sont possibles. Par exemple, un protocole à base de kétamine plus ou moins associée à de la xylazine ou du midazolam peut être utilisé et n'a pas montré d'influence sur les paramètres hématologiques chez des tortues de Floride (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

c) *Désinfection du site de prélèvement*

Il est fortement recommandé de nettoyer et désinfecter le site de ponction veineuse. L'usage de brosse à poils synthétiques comme un scrub est parfois nécessaire pour nettoyer adéquatement la peau écaillée des reptiles. Il n'existe pas de consensus concernant le choix de l'antiseptique utilisé (Divers and Stahl, 2018).

d) Les sites de prélèvement chez la tortue

(1) La veine jugulaire

Ce site est considéré par de nombreux auteurs comme le « gold standard » chez les chéloniens car il permet l'obtention d'un prélèvement de qualité et minimise les risques de contamination par la lymphe (Chitty and Raftery, 2013). Ce site de ponction est donc la technique de choix chez les animaux dociles ou sédatisés.

- Anatomie (Figure 31)

Les trajets veineux sont très variables selon les espèces (Mader, 2006). En effet, chez certaines d'entre elles, la veine jugulaire externe est constituée d'une branche dorsale à laquelle s'ajoute une branche ventrale. Le trajet de la veine jugulaire externe est superficiel : elle est parfois observée à travers la peau. En pratique, il peut être utile de se repérer grâce au tympan : la veine jugulaire passe au même niveau que le tympan et jusqu'à la base du cou (Mans, 2008)(Redrobe and MacDonald, 1999).

Généralement, les branches jugulaires droites sont plus grandes que les gauches même si cette affirmation est controversée (Chitty and Raftery, 2013)(Fudge, 2000).

L'artère carotide est localisée plus profondément et plus ventralement que la veine jugulaire mais son trajet est parallèle à la veine ce qui explique le risque d'hématome lors de perforation (Jacobson, Schumacher and Green, 1992).

Enfin, chez certaines espèces de tortue, un large vaisseau lymphatique cervical sépare les branches dorsale et latérale des veines jugulaires (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004) (Le Net, 2015).



Figure 31 : anatomie de la région cervicale chez une tortue d'Hermann (*Testudo hermanni*) (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004). Notez l'association étroite entre la veine jugulaire dorsale (1), l'artère carotide (2), le vaisseau lymphatique cervical (3) et la veine jugulaire ventrale (4)

- Contention et réalisation (Figure 32)

Cette méthode de prélèvement nécessite deux opérateurs. Pour cela, l'assistant maintient fermement la carapace tout en bloquant les membres antérieurs de la tortue latéralement. La tête est étendue puis maintenue crânialement et vers la gauche par l'opérateur afin de permettre l'accès à la veine jugulaire droite. La préhension de la tête est réalisée par abord ventral afin d'éviter la rétraction défensive de la tête (Sykes and Klaphake, 2015). Pour cela, la tête de la tortue est saisie avec deux doigts : l'index est placé sur la partie dorsale du crâne et le pouce est placé sous la mandibule. Pour faciliter la préhension de la tête, il est possible de pousser les membres postérieurs vers l'avant ce qui incite la tortue à étendre sa tête hors de la carapace (Jacobson, Schumacher and Green, 1992).

Une asepsie minutieuse est requise puis l'opérateur repère la veine. La veine jugulaire est superficielle, il est donc parfois possible de la voir sans compression. Dans le cas contraire, une légère compression peut être effectuée par l'assistant à la base du cou, du côté droit. Il est parfois difficile de distinguer les veines des structures musculotendineuses (Redrobe and MacDonald, 1999). Dans certains cas, l'utilisation d'une sonde Doppler à 8 MHz peut aider à localiser la veine (Chitty and Raftery, 2013). Lors de stress, les espèces du genre *Testudo* retiennent parfois de l'air dans leur œsophage ce qui complique l'identification des structures anatomiques (Redrobe and MacDonald, 1999).

L'aiguille est ensuite insérée dans la veine tangentiellement et cranio-caudalement en prenant soin d'écartier tout prélèvement contaminé par de la lymphe. Après retrait de l'aiguille, une compression sur le site de ponction permet d'éviter la formation d'hématome due à la proximité de l'artère carotide (Chitty and Raftery, 2013).



Figure 32 : technique de prélèvement sanguin au niveau de la veine jugulaire chez une tortue grecque (Mader, 2006)

- Avantages et inconvénients du site de prélèvement (Tableau XIII)

Tableau XIII : avantages et inconvénients du prélèvement sanguin à la veine jugulaire (Redrobe and MacDonald, 1999) (Mader, 2006) (Kirchgessner and Mitchell, 2009)

Avantages	Inconvénients
Risque moindre de lymphodilution (controversé) Permet l'obtention d'un grand volume sanguin Risque d'infection moindre Technique de choix chez les tortues < 4 kg	Nécessite deux opérateurs Difficulté pour extérioriser la tête chez les animaux agressifs ou de grande taille Risque d'hématome si artère carotide touchée

(2) Le sinus sub-carapacial

Ce sinus est aussi appelé sinus cervical, sinus veineux nuchal ou sinus sub-vertébral.

- Anatomie (Figure 33)

Le sinus sub-carapacial est formé par la jonction des vaisseaux intercostaux les plus crâniens (provenant des veines azygotes) et l'anastomose cervicale caudale des veines jugulaires droite et gauche (Mader, 2006). Notons que le trajet des vaisseaux intercostaux est intimement lié aux vertèbres cervicales.

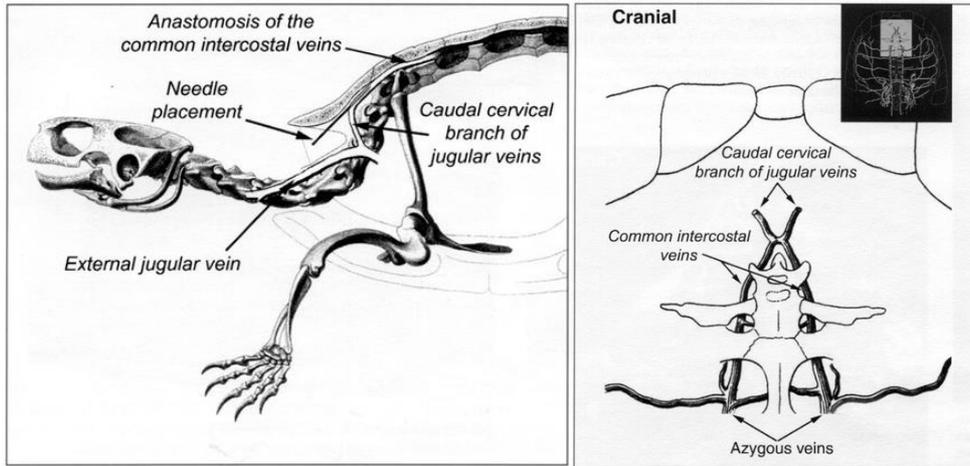


Figure 33 : localisation du sinus sub-carapacial chez la tortue (Hernandez-Divers, Hernandez-Divers and Wyneken, 2002)

- Contention et réalisation (Figure 34)

Cette méthode de prélèvement peut se réaliser seul même si l'aide d'un assistant est appréciée. Les membres antérieurs sont maintenus par l'assistant latéralement et la tête est poussée vers l'intérieur de la carapace. Il est malgré tout possible d'accéder à la veine sans restreindre les membres mais la visibilité et qualité de l'asepsie seront moindres (Chitty and Raftery, 2013). L'aiguille montée sur une seringue adaptée peut préalablement être pliée. Elle est alors insérée en direction caudo-dorsale (avec un angle approximatif de 60°) au niveau de la jonction entre la peau du cou et la carapace, sur la ligne médiane (Kirchgeßner and Mitchell, 2009). Une fois la peau pénétrée, l'opérateur applique une pression négative tout en avançant doucement l'aiguille jusqu'à entrer dans le sinus veineux (Sykes and Klaphake, 2015). En cas de contact avec les vertèbres cervicales, l'aiguille est retirée doucement et réorientée crânialement ou caudalement (Mader, 2006).



Figure 34 : technique de prélèvement sanguin au sinus sub-caparacial chez une tortue (*Pyxis sp*) (Sykes and Klaphake, 2015)

- Avantages et inconvénients du site de prélèvement (*Tableau XIV*)

Tableau XIV : avantages et inconvénients du prélèvement sanguin au sinus sub-carapacial (Chitty and Raftery, 2013) (Hernandez-Divers, Hernandez-Divers and Wyneken, 2002) (Innis et al., 2010)

Avantages	Inconvénients
Contention plus aisée qu'avec un prélèvement à la veine jugulaire Permet l'obtention d'un grand volume sanguin Réalizable par un seul opérateur Adaptée aux petits individus	Risque de lymphodilution plus élevée qu'à la veine jugulaire Risque d'hématome ou d'abcès en cas de vertèbres touchées Risque de parésie des membres Nécessite de longues aiguilles chez les grands individus

L'article de Innis et al. décrit en effet le cas de trois tortues atteintes de parésie unilatérale ou bilatérale des membres antérieurs apparaissant dans les jours suivant la ponction veineuse. Dans un cas, une parésie des membres postérieurs était également présente. Ces troubles se sont résolus en quelques semaines ou quelques mois. Cependant, il est important de signaler que les animaux atteints étaient initialement agressifs et bougeaient leurs têtes pendant la ponction veineuse (Innis *et al.*, 2010).

(3) Les veines caudales dorsale et ventrale

Elles sont également appelées veines coccygiennes dorsale et ventrale. Chez les chéloniens, l'emplacement de ces veines varie considérablement selon les espèces : elles peuvent être dorsales, latérales et/ou ventrales (Sykes and Klaphake, 2015). Nous détaillerons ici les méthodes de prélèvement aux veines caudales dorsale et ventrale qui sont les plus fréquemment décrites.

(a) Veine caudale dorsale

Il s'agit probablement de la veine coccygienne la plus fréquemment ponctionnée (Mader, 2006).

- Anatomie (*Figure 35*)

La veine se trouve au niveau de la ligne médiane dorsale de la queue entre les vertèbres caudales et la peau. Il existe cependant des variations anatomiques selon les individus (Chitty and Raftery, 2013). Les vertèbres coccygiennes des chéloniens étant dépourvues d'apophyses épineuses, la veine caudale dorsale est relativement superficielle.

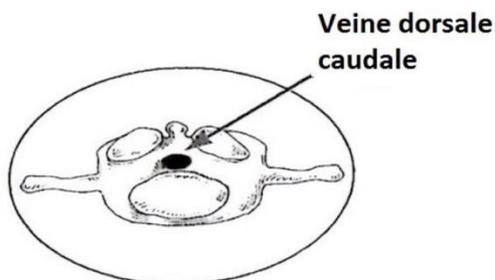


Figure 35 : localisation de la veine dorsale caudale sur coupe transversale de queue de tortue (Petit, 2014)

- Contention et réalisation (Figure 36)

La tortue est maintenue immobile sur le plastron. L'opérateur tend alors la queue vers lui dans le plan médian et légèrement ventralement. Avec de l'expérience, il est également possible de prélever l'animal lorsque la queue est repliée sous la carapace (Chitty and Raftery, 2013). Une désinfection méticuleuse est nécessaire, cette zone étant fréquemment souillée. Puis l'opérateur introduit l'aiguille crânialement sur la ligne médiane dorsale de la queue et au niveau du dernier tiers de la longueur de la queue (Petit, 2014). Une pression négative est alors appliquée jusqu'à obtention de sang au sein de la seringue. Si une vertèbre est touchée avec l'aiguille, il conviendra de retirer légèrement cette dernière et de la rediriger légèrement plus crânialement ou caudalement (Mader, 2006).



Figure 36 : technique de prélèvement sanguin à la veine caudale dorsale chez une tortue (espèce non précisée) (Chitty and Raftery, 2013)

(b) Veine caudale ventrale

- Anatomie

Le trajet de la veine caudale ventrale est situé sur la ligne médiane ventrale de la queue et longe ventralement les corps vertébraux caudaux.

- Contention et réalisation (Figure 37)

L'animal est immobilisé sur le plastron et au bord d'une table de sorte à pouvoir accéder à sa queue par abord ventral. La ponction veineuse a lieu en un point situé entre le tiers et la moitié de la distance entre le cloaque et l'extrémité de la queue. Après désinfection, l'aiguille est insérée crânialement avec un angle de 45° sur la ligne médiane ventrale de la queue (Sykes and Klaphake, 2015). Une pression négative est appliquée jusqu'à collecte de sang.



Figure 37: technique de prélèvement sanguin à la veine caudale ventrale chez une tortue (espèce non précisée) (Sykes and Klaphake, 2015)

- Avantages et inconvénients communs aux prélèvements aux veines caudales dorsale et ventrale (*Tableau XV*)

Tableau XV : avantages et inconvénients du prélèvement sanguin aux veines caudales dorsale et ventrale (Chitty and Raftery, 2013) (Redrobe and MacDonald, 1999)

Avantages	Inconvénients
Pratique pour les animaux non abordables frontalement Méthode peu invasive	Volume sanguin collecté restreint Risque élevé de lymphodilution Risque élevé d'infection (zone contaminée et parfois difficile à nettoyer) Risque de traumatisme médullaire lors de ponction à la veine coccygienne dorsale

(4) Le plexus veineux post-occipital

Ce plexus est également appelé sinus veineux occipital.

- Anatomie

Le sinus veineux occipital est constitué de la jonction des veines temporales droite et gauche qui sont issues des veines jugulaires (Martínez-Silvestre *et al.*, 2002). Il est situé ventralement à la crête supra-occipitale (Le Net, 2015).

- Contention et réalisation (*Figure 38*)

La tête de la tortue est saisie par un assistant et son cou est étendu cranio-ventralement. Avec de l'expérience, la contention peut être réalisée par l'opérateur seul en abaissant la tête avec l'index et en tenant la carapace de part et d'autre avec les autres doigts (Martínez-Silvestre *et al.*, 2002). L'opérateur palpe la crête supra-occipitale puis l'aiguille est insérée caudo-crânialement à travers la peau juste ventro-caudalement à la crête (Redrobe and MacDonald, 1999). Une pression négative est alors appliquée jusqu'à ce que du sang soit visible au sein de la seringue.

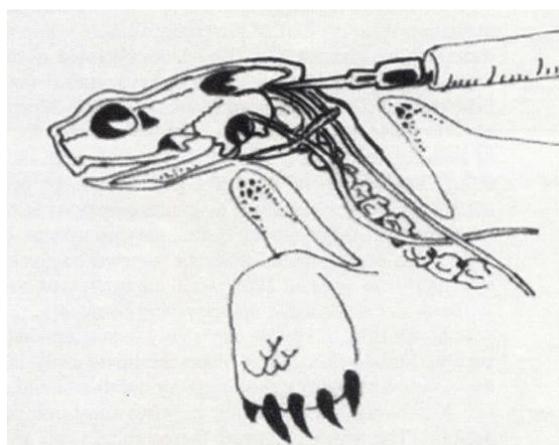


Figure 38 : technique de prélèvement sanguin au plexus veineux post-occipital chez une tortue (Martínez-Silvestre *et al.*, 2002)

- Avantages et inconvénients du site de prélèvement (*Tableau XVI*)

Tableau XVI : avantages et inconvénients du prélèvement sanguin au sinus veineux occipital (Chitty and Raftery, 2013) (Martínez-Silvestre et al., 2002)

Avantages	Inconvénients
Obtention d'un grand volume sanguin chez les grands individus Sinus plus large que les autres veines chez <i>Trachemys scripta elegans</i> d'où une moindre lymphodilution	Risque élevé de lymphodilution chez de nombreuses espèces Risque élevé de lésion de la moelle épinière et du cerveau Contention difficile chez les grands individus

(5) La veine brachiale

La veine brachiale est également appelée sinus brachial, veine ulnaire ou encore veine céphalique.

- Anatomie (*Figure 39*)

La veine brachiale est un plexus de vaisseaux situé près du tendon du triceps au niveau de l'articulation radiohumérale.



Figure 39 : anatomie du plexus veineux de la région caudale du membre antérieur chez une tortue d'Hermann (*Testudo hermanni*) (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004)

- Contention et réalisation (*Figure 40*)

Le membre antérieur prélevé est saisi et tendu par un assistant ou par l'opérateur. Le tendon du triceps brachial est palpé près de la face caudale de l'articulation radiohumérale, et l'aiguille est insérée juste caudalement ou ventralement au tendon (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004). Une pression négative au cours de laquelle la seringue est maintenue parallèle à l'avant-bras est appliquée (Sykes and Klaphake, 2015).



Figure 40 : technique de prélèvement sanguin au niveau de la veine brachiale chez une tortue d'Hermann (*Testudo hermanni*) (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004)

- Avantages et inconvénients du site de prélèvement (*Tableau XVII*)

Tableau XVII : avantages et inconvénients du prélèvement sanguin à la veine brachiale (Mans, 2008) (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013)

Avantages	Inconvénients
Pratique chez les individus > 1 kg et chez les individus non coopératifs	Réalisation difficile Possible prélèvement de l'artère brachiale

La probabilité de contamination par de la lymphe lors de prélèvement à ce site est largement discutée. Certains auteurs rapportent une haute probabilité de lymphodilution (Chitty and Raftery, 2013) même si certaines études ont montré que ce site est moins contaminé par la lymphe que les autres sites (Mans, 2008).

(6) Coupe de griffe

- Contention et réalisation

L'immobilisation d'un membre est requise. Un nettoyage et une désinfection soignée de la griffe sont nécessaires puis l'ongle est coupé au tiers distal à l'aide d'un instrument tranchant ou coupant comme une lame de bistouri stérile (Le Net, 2015). Le sang est alors récolté par écoulement spontané (Fudge, 2000). Idéalement, une solution astringente est ensuite appliquée sur la griffe coupée pour favoriser l'hémostase (Campbell and Ellis, 2007).

- Avantages et inconvénients du site de prélèvement

Il s'agit d'une technique douloureuse et discutable éthiquement. De plus, elle ne permet pas l'obtention d'échantillon sanguin satisfaisant : la contamination par de l'urine ou des fèces est fréquente et le volume sanguin obtenu est très faible (Chitty and Raftery, 2013). Enfin, les vaisseaux lymphatiques sont sectionnés en même temps que les vaisseaux sanguins, d'où la survenue d'une contamination lymphatique (Sykes and Klaphake, 2015). Cette méthode de prélèvement sera donc utilisée lorsqu'aucune autre technique n'a pu être réalisée.

(7) Cardiocentèse

La cardiocentèse peut être réalisée lorsqu'aucune autre technique n'a pu être mise en œuvre. Cependant, son utilisation est généralement réservée à l'administration d'euthanasiant (Sykes and Klaphake, 2015).

- Anatomie

Chez les tortues, l'aire de projection cardiaque se situe au niveau de la jonction entre les écailles abdominales et pectorales du plastron (*Figure 41*).

- Contention et réalisation

Le plastron de l'animal doit être accessible. Après nettoyage et désinfection, une aiguille de longueur adéquate est insérée directement à travers le plastron sur la ligne médiane au niveau de la jonction entre les écailles pectorales et abdominales (Sykes and Klaphake, 2015). Chez les animaux aux plastrons minéralisés, une trépanation du plastron au même endroit est nécessaire. L'aiguille insérée est alors utilisée comme un trocart au sein duquel une aiguille plus fine est introduite (Petit, 2014). L'orifice est ensuite comblé avec de la cire ou de l'acrylique (Redrobe and MacDonald, 1999).



Figure 41 : technique de cardiocentèse chez une tortue juvénile (espèce non précisée) (Campbell, 2015b)

- Avantages et inconvénients du site de prélèvement (Tableau XVIII)

Tableau XVIII : avantages et inconvénients du prélèvement sanguin au niveau du cœur (Chitty and Raftery, 2013) (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013) (Sykes and Klaphake, 2015) (Redrobe and MacDonald, 1999)

Avantages	Inconvénients
Pratique chez de très petits animaux < 50 g ou chez des animaux aux plastrons non minéralisés (ex : maladie métabolique osseuse) Risque moindre de lymphodilution	Technique invasive Risque de lésion et de contamination du myocarde et du sac péricardique Accès difficile nécessitant une aiguille de longueur importante Trépanation nécessaire si minéralisation du plastron Difficulté de stabiliser la fonction cardiaque Possible dilution par le liquide péricardique

(8) Autres sites de prélèvement

Le prélèvement sanguin au niveau du sinus orbital est également décrit chez la tortue. Cette technique permet de recueillir un petit volume sanguin. L'opérateur introduit un tube capillaire médialement entre les paupières et frotte la conjonctive pour rompre les vaisseaux sanguins. Cependant, les traumatismes de la cornée sont fréquents et le sang est dilué par les fluides extravasculaires (Jacobson, Schumacher and Green, 1992).

La veine fémorale constitue également un site de prélèvement (Figure 42) : il est envisagé dans les cas où les autres sites recommandés ne parviennent pas à fournir un échantillon satisfaisant. La ponction sanguine de la veine fémorale ne permet d'obtenir qu'un faible volume de sang et est régulièrement contaminée par la lymphe (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004).



Figure 42 : à gauche, anatomie de la veine fémorale en région caudale du membre postérieur et à droite, technique de prélèvement sanguin au niveau de la veine fémorale chez une tortue d'Hermann (*Testudo hermanni*) (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004)

e) *Contamination lymphatique et conséquences*

(1) *Système lymphatique et composition de la lymphe*

Le système lymphatique des reptiles est un système ouvert contenant à la fois des vaisseaux et des sinus dans certains organes et sous la peau. Il s'agit d'un réseau qui, par le biais du liquide extracellulaire, collecte le plasma et les autres cellules sanguines qui se sont échappés des capillaires et les renvoie au système vasculaire. Les vaisseaux lymphatiques suivent donc un trajet particulièrement proche des vaisseaux sanguins ce qui explique le risque de contamination lymphatique lors de ponction veineuse (Vitt and Caldwell, 2014).

La lymphe est constituée de 95 % d'eau, les 5 % restants étant des protéines plasmatiques et d'autres substances contenues dans le sang. La composition de la lymphe varie continuellement avec celle du sang et celle du liquide extracellulaire. La composition du liquide extracellulaire varie quant à elle localement selon la fonction du tissu : par exemple, du liquide synovial et du liquide séreux sont retrouvés respectivement dans les articulations et dans les grandes cavités (Zwart, 2018). La composition de la lymphe varie donc selon la localisation des vaisseaux lymphatiques.

(2) *Lymphodilution et conséquences hématologiques*

La lymphe ayant une composition différente de celle du sang, la contamination lymphatique du sang fausse les analyses hématologiques. En effet, le PCV, la concentration en hémoglobine, et le nombre total d'érythrocytes et de leucocytes sont diminués lors de contamination lymphatique.

De plus, cette contamination est également à l'origine d'une coloration de fond bleutée sur les frottis (semblable à celle parfois causée par l'héparine) et empêche ainsi une lecture optimale des lames (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013)(Chitty and Raftery, 2013).

(3) *Importance de l'hémodilution selon le site de prélèvement*

Bien qu'il soit largement répandu que les échantillons prélevés à la veine jugulaire soient les moins contaminés par la lymphe, aucune étude définitive ne le prouve.

Des échantillons de sang provenant de la veine jugulaire de chéloniens ont été comparés à des échantillons provenant de la veine coccygienne et à des échantillons provenant du sinus veineux sub-carapacial (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013). Les échantillons du sinus veineux sub-carapacial ont été considérés comme les moins fiables. De plus, chez 20 % des animaux, le PCV mesuré était plus élevé dans l'échantillon provenant de la veine coccygienne que dans celui provenant de la veine jugulaire. Cela appuie donc l'hypothèse que la lymphodilution puisse également se produire lors de prélèvement à la veine jugulaire.

D'autres études réalisées chez certaines espèces de tortue comparent également l'importance de la lymphodilution selon le site de prélèvement (*Tableau XIX*).

Tableau XIX : synthèse de quelques études réalisées chez la tortue et évaluant l'impact du site de prélèvement sanguin sur la lymphodilution (Gottdenker and Jacobson, 1995) (López-Olvera et al., 2003) (Bulté, Verly and Blouin-Demers, 2006) (Medeiros et al., 2012)

Nom et année étude	Sites de prélèvement comparés	Espèce et nom commun	Nombre individus	Site à moindre lymphodilution	Paramètres significativement différents entre les 2 sites
Gottdenker et al - 1995	Sinus occipital Veine jugulaire	<i>Gopherus agrassizii</i> (tortue du désert)	12	Veine jugulaire	RBC, WBC, PCV, Hb
Lopez-Olvera et al - 2003	Veine brachiale Veine coccygienne dorsale	<i>Testudo marginata</i> (tortue bordée)	7	Veine brachiale	RBC, Ht, Hb
Bulté et al - 2006	Veine coccygienne Sinus sub-carapacial	<i>Graptemys geographica</i> (tortue géographique)	34	Veine coccygienne	Proportions d'échantillon avec hémomodilution visuelle
Medeiros et al - 2012	Veine coccygienne dorsale Sinus occipital	<i>Trachemys scripta elegans</i> (tortue à tempes rouges)	24	Sinus occipital	WBC et protéines totales

Aucune étude comparant les sites de prélèvement n'a été conduite chez la tortue grecque. Ainsi, d'autres études sont nécessaires pour mieux estimer l'incidence de la lymphodilution selon le site de ponction veineuse et l'espèce de chélonien.

Le trajet des vaisseaux lymphatiques longe souvent celui des vaisseaux sanguins ; une contamination lymphatique est donc fréquente lors de ponction sanguine chez les reptiles. La composition de la lymphe étant différente de celle du sang et variant selon le site, cette contamination fausse les analyses sanguines hématologiques et biochimiques. Tous les sites de prélèvement peuvent être concernés par cette contamination lymphatique d'où l'importance d'écarter tout prélèvement si un doute survient lors de la ponction veineuse. Afin d'éviter cette contamination, la veine jugulaire semble être le site de choix chez les chéloniens.

4. Évaluation de la qualité du prélèvement

Comme expliqué précédemment, la contamination du prélèvement sanguin par de la lymphe est fréquente chez la tortue. En pratique, cette contamination lymphatique est objectivée lorsqu'un liquide transparent ou séro-hémorragique est observé dans la seringue juste avant l'apparition de sang. Dans ce cas, le prélèvement est écarté et une nouvelle prise de sang doit être effectuée avec du matériel neuf (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

Dans les cas où la lymphodilution est difficile à évaluer, certains auteurs suggèrent de mesurer immédiatement le PCV et d'écartier l'échantillon s'il est inférieur à 10 % et que la clinique n'est pas en faveur d'une anémie sévère (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013). D'autres auteurs considèrent que si le PCV est fortement diminué, qu'aucun signe de régénération n'est observé au frottis et qu'une augmentation du nombre de petits lymphocytes est constatée, alors la probabilité de contamination lymphatique est élevée (Sykes and Klaphake, 2015).

Une hémolyse induite par une technique de prélèvement inadaptée peut également altérer la qualité du prélèvement. L'hémolyse est mise en évidence lors de l'observation de cellules lysées au sein du frottis sanguin ou lorsque le plasma est de couleur rosée après centrifugation de l'échantillon (Thrall *et al.*, 2012).

5. Stockage et conservation du prélèvement

Peu d'études s'intéressent aux méthodes de stockage du sang reptilien avant la réalisation d'analyses hématologiques. Même si les études existantes n'ont été menées que chez un faible nombre d'espèces, il faut considérer que les analyses sanguines doivent être réalisées le plus rapidement possible afin d'éviter les artefacts dus aux anticoagulants mais également l'hémolyse rapide de l'échantillon (Campbell, 2014). La vitesse à laquelle l'hémolyse se met en place dépend de l'espèce de reptile étudiée et peu d'études existent à ce sujet.

- Conservation du prélèvement en fonction du temps et de l'anticoagulant

Une étude s'intéresse à l'hémolyse chez les pythons (*Python molurus bivittatus*) en fonction du temps et en fonction de l'anticoagulant choisi. Les marqueurs de l'hémolyse utilisés sont le nombre de cellules lysées parmi un comptage de 200 leucocytes et l'évaluation qualitative de la couleur rose du plasma à partir de tubes à microhématocrite. Ces auteurs ont ainsi montré que les résultats obtenus après 24 heures de stockage à 4°C sont similaires à ceux obtenus juste après le prélèvement que ce soit lors de l'utilisation d'héparine ou d'EDTA (Harr, Raskin and Heard, 2005).

Des études supplémentaires menées chez d'autres espèces sont nécessaires pour comprendre l'influence de l'anticoagulant sur la conservation des échantillons sanguins.

- Conservation du prélèvement en fonction du temps et de la température de stockage

Une autre étude (Petersen, 2016) s'intéresse à la qualité des frottis en fonction du temps et en fonction de la température de stockage du sang chez la tortue d'Hermann (*Testudo hermannii*). Des frottis ont été réalisés directement après le prélèvement de sang puis des échantillons ont été stockés à température ambiante ou au réfrigérateur. Après 1h, 48h et 96h, des frottis ont été réalisés et une évaluation comprenant la qualité macroscopique et microscopique ainsi que la croissance bactérienne et la présence de vacuoles cytoplasmiques dans les érythrocytes a été réalisée. D'après les résultats obtenus, les frottis sanguins doivent être conservés à la température du réfrigérateur pendant 48 heures maximum pour obtenir des résultats fiables. Les échantillons de sang stockés à la température du réfrigérateur pendant 96h ont également permis

l'obtention d'une numération formule sanguine fiable, mais ils étaient beaucoup plus fastidieux à évaluer. Au contraire, les échantillons de sang conservés à température ambiante pendant 48h et plus n'ont pas fourni de résultats fiables et doivent donc être jetés.

Chez des tortues caouannes (*Caretta caretta*), une hémolyse modérée a été observée au bout de 48h et 96h suivant le prélèvement et ce, malgré un stockage réfrigéré (Divers and Stahl, 2019).

Enfin s'il est nécessaire de stocker des échantillons de sang pendant une durée de 48h ou plus, par exemple lors de l'expédition vers des laboratoires externes, des mesures appropriées sont recommandées tels qu'un emballage isolé et un refroidissement supplémentaire avec de la glace.

- Conservation du prélèvement en fonction de l'ajout d'albumine

Certains auteurs ont suggéré que l'ajout d'albumine en prévention éviterait la lyse cellulaire ce qui n'est pas le cas d'après plusieurs études (Harr, Raskin and Heard, 2005).

Il convient donc de réaliser les analyses hématologiques dans les 24 à 48 heures suivant le prélèvement, le plus tôt étant le mieux. Le stockage se réalise sous réfrigération à 4°C et l'ajout d'albumine est inutile.

C. Méthodes d'analyse chez les reptiles

1. Automate

La présence d'un noyau au sein des thrombocytes et des érythrocytes reptiliens complique largement l'utilisation des automates pour l'établissement d'une numération formule sanguine. D'après certains auteurs, le nombre total d'érythrocytes, l'hématocrite et la concentration en hémoglobine peuvent tout de même être déterminés par des automates (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013). En effet, l'hématocrite peut être déterminé par des compteurs de cellules électroniques à condition que ces derniers aient été ajustés avec précision pour chaque espèce en fonction des différentes tailles des érythrocytes (Campbell and Ellis, 2007). De nombreux auteurs recommandent cependant d'avoir un regard critique sur l'hématocrite calculé par l'automate car les méthodologies calculées pour la détermination de l'hématocrite sont rarement validées chez les reptiles (Divers and Stahl, 2019).

De même, le comptage du nombre total d'érythrocytes par les automates peut être biaisé lorsque les normes spécifiques à l'espèce ne sont pas fournies à l'automate (Divers and Stahl, 2019). La numération des érythrocytes avec les compteurs de cellules électroniques est légèrement augmentée à cause de l'inclusion de leucocytes et de thrombocytes dans la numération. Cependant, d'après certains auteurs ces cellules supplémentaires comptabilisées comme des érythrocytes ne sont pas significatives dans la plupart des échantillons car elles représentent environ 0,1% de la population de cellules sanguines périphériques (Campbell, 2015b).

D'une manière générale, le nombre total d'érythrocytes et la concentration en hémoglobine sont rarement déterminés grâce à l'automate chez les reptiles : les limitations méthodologiques des analyseurs et l'incompatibilité avec l'analyse des cellules nucléées rendent peu fiables les données fournies. Certaines méthodes d'analyse automatique nécessitent des techniques sophistiquées d'analyse cellulaire ou de lyse des cellules pour éliminer les noyaux (Divers and Stahl, 2019).

L'étude de Bielli et al. évalue la fiabilité d'un analyseur de sang semi-automatisé pour la numération des érythrocytes et le calcul de l'hématocrite chez des tortues d'Hermann (*Testudo hermanni boettgeri*). Le compteur de cellules à impédance utilisé semblait surestimer le nombre total d'érythrocytes et sous-estimer la détermination de l'hématocrite mais d'une manière peu susceptible d'affecter le jugement clinique. Dans cette étude, la détermination semi-automatique de ces paramètres a donc été considérée comme acceptable pour une utilisation clinique. En revanche, les chercheurs recommandent que l'utilisation d'un tel équipement soit préalablement validée afin d'obtenir des résultats fiables (Bielli *et al.*, 2015).

2. Technique de centrifugation par microhématocrite

Cette technique permet d'obtenir le PCV. Chez les reptiles, tout comme chez les mammifères, l'usage de tube à microhématocrite est considéré comme la méthode la plus rapide, la plus pratique et la plus reproductible : elle est donc largement préférée à l'usage de l'automate (Mader, 2006). Pour garantir une fiabilité optimale, il est conseillé de toujours réaliser au moins deux mesures du PCV à l'aide de deux tubes à microhématocrite.

La technique est semblable à celle utilisée chez les mammifères. Le tube à microhématocrite est rempli de sang par capillarité en l'introduisant horizontalement dans le tube contenant l'échantillon sanguin ou directement à partir de la seringue. Une fois le tube rempli à 70-90 %, l'extrémité du tube est scellée en l'introduisant dans de la cire molle. Puis, les tubes capillaires sont centrifugés idéalement dans une centrifugeuse à microhématocrite à 12 000 g pendant 5 minutes (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013). Après centrifugation, les composants du sang sont séparés dans le tube capillaire (Figure 43). En haut du tube capillaire, la colonne jaune claire correspond au plasma de l'animal. La colonne rouge observée en bas du tube correspond aux érythrocytes sédimentés. Ces deux colonnes sont séparées par une fine bande blanche correspondant à la couche leucocytaire qui contient des leucocytes (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

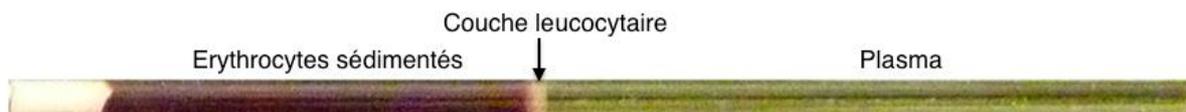


Figure 43 : aspect d'un tube à microhématocrite après centrifugation (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013)

La lecture du PCV se réalise grâce à une carte de lecture en alignant l'interface cire-érythrocytes avec la ligne 0 et le haut de la colonne de plasma avec la ligne 100 de la carte. Le PCV est obtenu en lisant la valeur indiquée sur l'échelle correspondant au haut de la colonne d'érythrocytes (Figure 44).

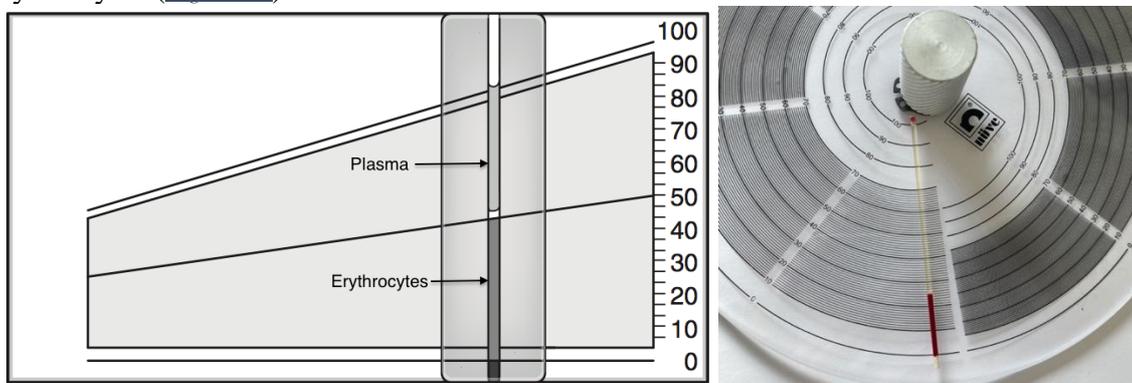


Figure 44 : principe de lecture du PCV sur une carte de lecture linéaire à gauche et sur un dispositif circulaire à droite (Samour et al., 2016) (photographie personnelle)

La technique de centrifugation par microhématocrite permet également d'évaluer la couleur du plasma et d'obtenir des informations supplémentaires sur l'état du patient. Ainsi, le plasma doit être clair à jaune clair. Un plasma jaune orangé chez les reptiles herbivores, ou un plasma jaune verdâtre chez les serpents, peut être dû aux pigments contenus dans l'alimentation (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013). Une coloration verte du plasma peut indiquer une hyperbiliverdinémie. La présence d'une hyperbilirubinémie se traduit par un plasma de couleur jaune intense tandis qu'une hémolyse engendre une coloration rougeâtre du plasma. Lorsqu'une hémolyse est suspectée, il convient de distinguer une hémolyse artéfactuelle induite par la technique de prélèvement d'une hémolyse intravasculaire à l'origine d'une anémie (Thrall *et al.*, 2012).

3. Méthode de cyanméthémoglobine

Il s'agit de la méthode standard de détermination de la concentration en hémoglobine chez les reptiles. Comme expliqué précédemment, les automates peuvent également être utilisés pour cette détermination (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

La méthode de cyanméthémoglobine nécessite une solution Drabkin. Le principe est le suivant : lorsque l'échantillon de sang est mélangé à la solution de Drabkin, les érythrocytes sont lysés et toutes les formes d'hémoglobine sont oxydées en méthémoglobine par le ferricyanure de potassium de la solution. Ensuite, la méthémoglobine est transformée en cyanméthémoglobine par le cyanure de potassium. Enfin, l'absorbance de la cyanméthémoglobine est mesurée grâce à un spectrophotomètre à une longueur de 540 nm puis la concentration en hémoglobine correspondante est trouvée grâce à des tables reliant proportionnellement absorbance et concentration en hémoglobine (Abid, 2018).

La méthode de cyanméthémoglobine est réalisée classiquement chez les reptiles mais une modification est à prendre en compte au vu du caractère nucléé des érythrocytes : le mélange réactif-sang doit être centrifugé avant la lecture d'absorbance. Ainsi, les noyaux libres des érythrocytes lysés sont éliminés ce qui évite une surestimation de la concentration en hémoglobine (Campbell, 2015b).

La méthode de cyanméthémoglobine peut donc être réalisée manuellement en prenant soin de centrifuger le mélange avant lecture, ou par l'intermédiaire d'analyseurs automatiques comme les hémoglobinomètres (Jacobson and Garner, 2020). De nombreux automates employés classiquement chez les mammifères utilisent cette méthode mais il conviendra d'être prudent lors de l'interprétation puisqu'aucune centrifugation n'est réalisée avant lecture de l'absorbance.

La réaction d'azide-méthémoglobine constitue une autre méthode de mesure de la concentration en hémoglobine et repose sur le même principe que la réaction de cyanméthémoglobine. Elle est utilisée dans l'hémoglobinomètre HemoCue® B-Hemoglobin et offre ainsi une analyse fiable, facile à utiliser et rapide de l'hémoglobine chez les reptiles ('American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) 39th Annual Meeting: In conjunction with the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) 55th Annual Meeting [en ligne]', 2004). Ce dispositif se compose de microcuvettes jetables contenant le réactif et d'un photomètre. Les réactions induites par le réactif provoquent l'hémolyse des érythrocytes puis l'hémoglobine est convertie en méthémoglobine puis en azide-méthémoglobine dont l'absorbance est mesurée à deux longueurs d'onde (*Figure 45*) (Nkrumah *et al.*, 2011).



Figure 45 : exemple d'hémoglobinomètre, l'analyseur HemoCue Hb 201+, utilisé pour la mesure de la concentration en hémoglobine (Estridge and Reynolds, 2012)

De plus, ce dispositif ne nécessite qu'une goutte de sang ce qui est pratique lorsque l'opérateur ne dispose qu'un faible volume sanguin (Jacobson and Garner, 2020).

4. Hémocytomètre et comptage cellulaire

L'hémocytomètre est une lame en verre quadrillée et composée de différentes chambres de volume variable. Cette lame permet de dénombrer les leucocytes chez les reptiles. En effet, comme expliqué précédemment, l'existence de noyau au sein des érythrocytes et des thrombocytes chez les reptiles fausse les comptages cellulaires réalisés par les automates. Le comptage de leucocytes est donc effectué manuellement grâce à un système de dilution de sang et de comptage cellulaire au sein de chambre hémocytométrique. Ainsi, le sang est dilué et coloré puis les cellules sanguines sont dénombrées au sein des chambres de l'hémocytomètre par observation au microscope. Enfin, des formules dépendant de la dilution de départ et du volume de l'hémocytomètre permettent de déterminer le nombre total de cellules par microlitre de sang (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013). Classiquement, la formule utilisée se présente sous la forme suivante (Estridge and Reynolds, 2012) :

$$\text{nb de cellules}/\mu\text{L} = \frac{\text{nb moyen de cellules dans la surface a} \times \text{facteur de dilution}}{\text{surface a (mm}^2\text{)} \times \text{hauteur de la chambre (mm)}}$$

Il existe de nombreux types d'hémocytomètre (*Figure 46* et *Figure 47*). Ils diffèrent par leur quadrillage et le volume qu'ils contiennent mais tous permettent de réaliser des dénombrements cellulaires. L'hémocytomètre de Neubauer est fréquemment utilisé. Il possède deux chambres disposées de part et d'autre du dispositif. Chaque chambre se compose de 9 grands carrés visibles lors de l'observation de la lame au microscope à un grossissement x40. Chaque grand carré contient un volume de 0,1 μL , chaque chambre contient donc 0,9 μL de sang dilué.

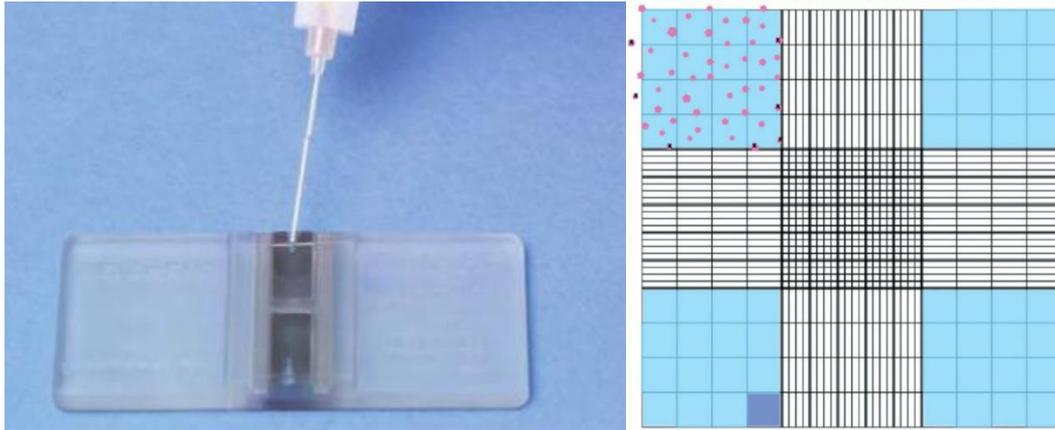


Figure 46 : à droite, remplissage d'une chambre de lecture au sein d'un hémocytomètre de Neubauer et à gauche, grille microscopique d'une chambre de lecture d'un hémocytomètre de Neubauer (Estridge and Reynolds, 2012)(Divers and Stahl, 2019)



Figure 47 : cellule de comptage Kova à gauche et hémocytomètre jetable à quatre chambres à droite (photographie personnelle)(Divers and Stahl, 2019)

Les cellules sont incluses dans le comptage en fonction de leur position dans la grille, mais il existe des méthodes de comptage différentes selon le type de cellule compté et selon les laboratoires. Classiquement, les cellules touchant les lignes gauche et inférieure des grands carrés sont toujours incluses dans le compte, alors que les cellules touchant les lignes droite et supérieure ne le sont pas (Figure 48) (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

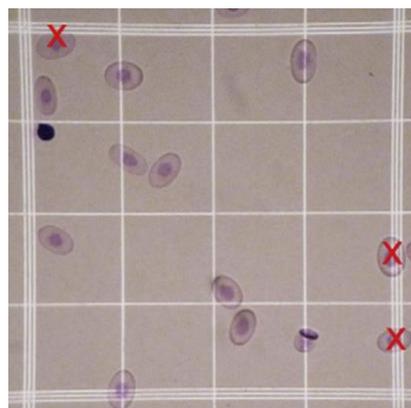


Figure 48 : méthode d'inclusion des cellules au sein d'un grand carré de l'hémocytomètre (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013). Notez que les cellules touchant les lignes droite et supérieure ne sont pas comptabilisées

Ces méthodes de comptage manuel peuvent avoir une erreur inhérente de 10 %, il faut donc, dans l'idéal, compter et comparer les deux côtés de la chambre : lorsque la différence entre les comptages obtenus à partir de chaque chambre dépasse 10 %, la procédure doit être recommencée (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

Deux méthodes sont classiquement utilisées pour dénombrer les leucocytes : les méthodes semi-directe et directe.

a) *Méthode semi-directe : solution de phloxine B associée au frottis*

La méthode semi-directe est mise en œuvre grâce à une solution de phloxine B et nécessite obligatoirement la réalisation d'un frottis. La solution de phloxine B colore seulement les granulocytes acidophiles c'est à dire les hétérophiles et les éosinophiles. Ces granulocytes colorés sont ensuite comptés dans l'hémocytomètre. Le WBC est ensuite calculé en utilisant le nombre d'hétérophiles et d'éosinophiles comptés dans l'hémocytomètre et le pourcentage de ces cellules parmi les leucocytes obtenu grâce à un frottis (Sykes and Klaphake, 2015).

Nous prendrons comme exemple le cas d'un comptage réalisé au sein d'un hémocytomètre de Neubauer. Les étapes à réaliser sont les suivantes (Divers and Stahl, 2019)(Campbell, 2015b).

- I) Obtention de la proportion de granulocytes acidophiles grâce au frottis sanguin
 - 1) Réaliser un frottis sanguin selon la méthode expliquée dans la partie 2 II.C.5.b).
 - 2) Réaliser un différentiel leucocytaire afin d'obtenir la proportion d'hétérophiles et d'éosinophiles parmi les leucocytes.

- II) Obtention du nombre de granulocytes acidophiles au sein des chambres de l'hémocytomètre
 - 3) Diluer le sang mélangé à l'anticoagulant avec la solution de phloxine B dans les proportions 1 : 32 puis mélanger durant 10 à 15 minutes.
 - 4) Introduire le sang dans les chambres de l'hémocytomètre puis le placer dans une chambre humide pendant 10 minutes pour permettre aux cellules de se stabiliser.
 - 5) A l'aide d'un microscope réglé sur l'objectif x40, compter les granulocytes visibles. Les cellules sont comptées au sein des 9 carrés de lecture et ce sur les deux chambres de l'hémocytomètre afin d'obtenir un nombre moyen de cellules dans 9 carrés de 0,1 µL chacun. Si les cellules ne sont pas réparties uniformément, il est recommandé de renouveler les manipulations à l'aide d'un nouvel hémocytomètre.

- III) Calcul du nombre total de leucocytes, WBC

$$\text{nb hétérophiles et éosinophiles}/\mu\text{L} = \underbrace{\text{nb moyen d'hétérophiles et éosinophiles dans 9 carrés de l'hémocytomètre}}_{\text{nb moyen d'hétérophiles et d'éosinophiles dans } 0,9\mu\text{L de sang dilué } 1 : 32} \times 1,11 \times 32$$

$$\underbrace{\hspace{15em}}_{\text{nb moyen d'hétérophiles et d'éosinophiles dans environ } 1 \mu\text{L de sang dilué } 1 : 32}$$

$$\underbrace{\hspace{25em}}_{\text{nb moyen d'hétérophiles et d'éosinophiles dans environ } 1 \mu\text{L de sang non dilué}}$$

Soit,

$$\text{WBC}/\mu\text{L} = \frac{(\text{nb hétérophiles} + \text{éosinophiles}/\mu\text{L}) \times 100}{\text{pourcentage d'hétérophiles et éosinophiles obtenu par frottis}}$$

Ce qui correspond à la formule suivante :

$$\text{WBC}/\mu\text{L} = \frac{\text{nb moyen d'hétérophiles et éosinophiles dans 9 carrés de l'hémocytomètre} \times 1,11 \times 32 \times 100}{\text{pourcentage d'hétérophiles et éosinophiles obtenu par frottis}}$$

Bien que réalisable manuellement, cette procédure est simplifiée grâce aux kits commerciaux Eopette® ou Avian Leukopet® remplaçant le système Unopette® mis au point pour dénombrer les éosinophiles chez les mammifères (Campbell, 2015b)(Nardini, Leopardi and Bielli, 2013). Cependant, malgré son utilisation dans de nombreuses études, certains auteurs ne recommandent l'utilisation du kit Avian Leukopet® seulement chez les oiseaux (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

b) Méthode directe : solution de Natt-Herrick

La méthode directe est réalisée grâce à la solution de Natt et Herrick qui colore tous les leucocytes. Cette solution a été développée spécifiquement pour le comptage des cellules sanguines aviaires et reptiliennes (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013). Les leucocytes sont comptés à l'aide d'un hémocytomètre puis le nombre total de leucocytes est calculé en tenant compte de la dilution de départ et du volume des chambres hémocytométriques.

Contrairement à la méthode semi-directe, la solution de Natt-Herrick permet également de colorer les érythrocytes et les thrombocytes et donc de réaliser un comptage de ces cellules selon une méthodologie similaire. Les érythrocytes sont aisément identifiés grâce à leur noyau et leur taille et les leucocytes sont colorés en bleu foncé ou violet ([Figure 49](#) et [Figure 50](#)) (Divers and Stahl, 2019).

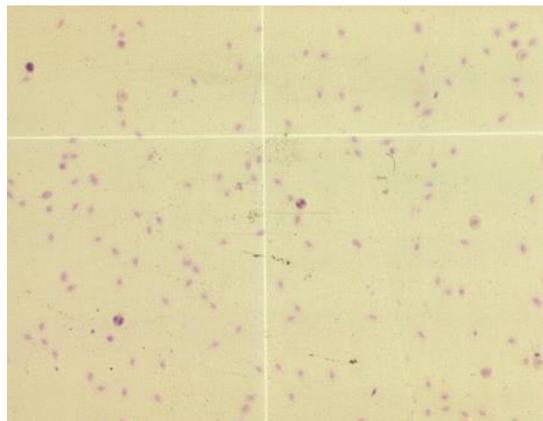


Figure 49 : aspect des leucocytes et des érythrocytes dans un hémocytomètre de Neubauer (Campbell, 2015b)

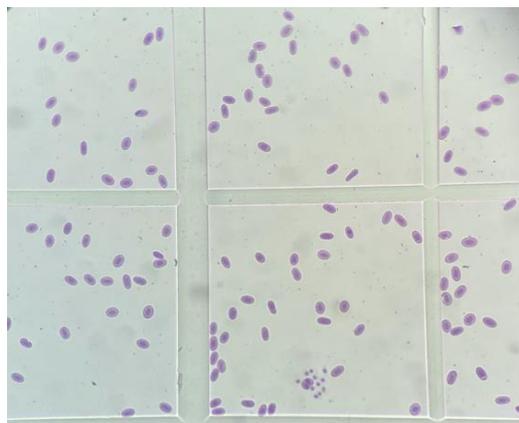


Figure 50 : aspect des érythrocytes et des thrombocytes au sein d'une cellule de comptage Kova (photographie personnelle)

Comme précédemment, nous nous placerons dans le cas où le comptage est réalisé au sein d'un hémocytomètre de Neubauer. Les étapes à suivre sont donc les suivantes (Divers and Stahl, 2019).

- I) Obtention du nombre de leucocytes au sein des chambres de l'hémocytomètre
- 1) Diluer le sang mélangé à l'anticoagulant avec la solution de Natt and Herrick dans les proportions 1 : 200. Laisser le sang se mélanger pendant une minute
 - 2) Introduire le sang dilué dans les chambres de l'hémocytomètre puis attendre 3 minutes que le contenu se stabilise
 - 3) A l'aide d'un microscope réglé sur l'objectif x40, compter les leucocytes. Les cellules sont comptées au sein des 9 grands carrés de lecture et ce sur les 2 chambres de l'hémocytomètre afin d'obtenir un nombre moyen de cellules dans 9 grands carrés de 0,1 µL chacun.
- II) Calcul du nombre total de leucocytes, WBC

$$\text{Nombre de leucocytes}/\mu\text{L} = \underbrace{\text{nb moyen de leucocytes dans 9 carrés de l'hémocytomètre}}_{\substack{\text{nb moyen de leucocytes dans } 0,9\mu\text{L de sang dilué } 1 : 200 \\ \text{nb moyen de leucocytes dans environ } 1 \mu\text{L de sang dilué } 1 : 200}} \times 1,11 \times 200$$

$$\underbrace{\hspace{15em}}_{\text{nb moyen de leucocytes dans environ } 1\mu\text{L de sang non dilué}}$$

Comme expliqué ci-dessus, les érythrocytes et les thrombocytes sont également colorés par la solution de Natt et Herrick : un dénombrement de ces cellules peut donc être réalisé. Cependant, les agrégats de thrombocytes sont fréquents au sein de l'hémocytomètre, c'est pourquoi cette méthode de dénombrement des thrombocytes est considérée comme peu fiable par certains auteurs (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

Les érythrocytes étant plus nombreux que les leucocytes, un comptage allégé des érythrocytes peut être réalisé. Ainsi, il conviendra de se placer au sein du grand carré central d'une chambre de lecture d'un hémocytomètre de Neubauer. Ce grand carré est lui-même composé de 25 petits carrés et seuls les érythrocytes contenus dans les petits carrés situés dans les coins et dans le petit carré central sont comptabilisés (Estridge and Reynolds, 2012). Puis, les formules suivantes permettent de calculer le nombre d'érythrocytes par microlitre de sang.

$$\text{nb d'érythrocytes}/\mu\text{L} = \underbrace{\text{nb moyen d'érythrocytes au sein des 5 petits carrés du grand carré central}}_{\substack{\text{nb moyen d'érythrocytes dans } 0,02 \mu\text{L de sang dilué } 1 : 200 \\ \text{nb moyen d'érythrocytes dans } 1 \mu\text{L de sang dilué } 1 : 200}} \times 5 \times 10 \times 200$$

$$\underbrace{\hspace{15em}}_{\text{nb moyen d'érythrocytes dans } 1\mu\text{L de sang non dilué}}$$

Soit,

$$\text{nb d'érythrocytes}/\mu\text{L} = \text{nb moyen d'érythrocytes au sein des 5 petits carrés du grand carré central} \times 10000$$

Pendant longtemps, la solution de Natt et Herrick devait être préparée manuellement ce qui représentait un inconvénient par rapport à la solution de phloxine B pour laquelle des kits commerciaux étaient disponibles. En 2019, un nouveau kit de préparation appelé Natt-Herrick-TIC® a été commercialisé et permet un comptage plus rapide des leucocytes et des érythrocytes. Une étude menée chez les oiseaux a montré que ce kit possédait une précision acceptable et une bonne concordance avec la méthode de préparation manuelle de la solution (Carisch *et al.*, 2019). Cependant, bien que le fabricant recommande son utilisation chez les reptiles, aucune étude n’a été menée pour évaluer sa fiabilité chez ces derniers.

Les solutions de phloxine B et de Natt-Herrick permettent donc d’obtenir le nombre total de leucocytes par des méthodes de comptage différentes (*Tableau XX*).

Tableau XX : comparaison des méthodes directe et semi-directe pour le dénombrement des leucocytes (Divers and Stahl, 2019) (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013) (Jacobson and Garner, 2020)

	Phloxine B	Natt-Herrick
Principe	Coloration des granulocytes acidophiles (hétérophiles et éosinophiles) puis calcul du nombre total de leucocytes grâce à la proportion de granulocytes acidophiles obtenue par frottis	Coloration de tous les leucocytes (et des érythrocytes et des thrombocytes) puis calcul du nombre total de leucocytes
Temps nécessaire	-Différentiel leucocytaire établi par frottis : 20 minutes -Comptage des granulocytes acidophiles dans hémocytomètre : 30 minutes -Calculs : 10 minutes	-Comptage cellulaire dans l’hémocytomètre : 60 à 90 minutes -Calculs : 5 minutes La réalisation d’un frottis en parallèle est fortement recommandée même si non indispensable au calcul du nombre de leucocytes : 20 minutes
Avantages	-Plus rapide que la solution de Natt-Herrick -Existence de kits commercialisés et prêts à l’emploi -Solution stable	-Permet de compter à la fois les leucocytes, les thrombocytes et les érythrocytes -Existence d’un kit commercialisé récemment -Ne nécessite pas la réalisation d’un frottis
Inconvénients	-Nécessite la réalisation d’un différentiel leucocytaire grâce à un frottis. Le comptage dépend donc de la qualité du frottis -Ne permet de compter que les leucocytes -Risque d’erreur majoré chez les espèces possédant peu d’hétérophiles comme les pythons -Sous-estime le nombre de leucocytes chez les espèces possédant des cellules inflammatoires non granulocytaires	-Méthode chronophage du fait que les lignées rouge et plaquettaire soient également colorées -Différenciation entre leucocytes et thrombocytes parfois difficile (une thrombocytose peut mener à une surestimation du nombre de leucocytes) -Faible durée de conservation de la solution

Quelques études se sont intéressées à la comparaison des deux méthodes de comptage chez les reptiles. Une étude compare les méthodes directe de Natt et Herrick et indirecte de l’Eosinophil Unopette® utilisant la solution de phloxine B chez les tortues caouannes (*Caretta caretta*). Le nombre total de leucocytes obtenu par la technique de Natt-Herrick était plus élevé qu’avec le kit Eosinophil Unopette®. Une troisième technique utilisant l’oxalate d’ammonium a été utilisée et les résultats obtenus avec cette méthode étaient plus concordants avec les résultats obtenus par la solution de Natt Herrick qu’avec la méthode Unopette® (Arnold, 1994).

Dans l'étude de Sheldon et al., les méthodes de comptage de leucocytes utilisant les solutions de Natt et Herrick et de phloxine B ont été comparées chez des tortues du Galapagos (*Chelonoidis spp*). Pour cela, une estimation du WBC est réalisée à partir de frottis sanguins de bonne qualité. Bien que cette méthode d'estimation du nombre de leucocytes par microlitre puisse manquer de précision lors de qualité médiocre du frottis sanguin, elle constitue un excellent moyen de contrôle pour comparer les résultats des méthodes de comptage manuel des cellules. Ainsi, la méthode Natt Herrick a montré une meilleure concordance avec l'estimation du nombre de leucocytes par microlitre réalisée à partir du frottis sanguin que la méthode de phloxine B (Sheldon *et al.*, 2016).

Au vu du peu d'études de comparaison réalisées chez les reptiles et de la mise sur le marché de nouveaux kits commerciaux, de nouvelles recherches sont nécessaires pour évaluer la fiabilité de ces méthodes de comptage chez les reptiles.

c) *Autres colorations permettant le dénombrement des leucocytes par utilisation d'un hémocytomètre*

D'autres colorations permettant l'établissement du WBC sont décrites dans la littérature même si elles sont moins couramment utilisées.

Par exemple, la coloration au bleu de toluidine constitue une méthode directe de comptage des leucocytes et permet de colorer les leucocytes, les érythrocytes et les thrombocytes. À ce jour, aucune comparaison n'a été faite entre la méthode au bleu de toluidine et les autres méthodes de dénombrement leucocytaire, mais certains auteurs estiment que les résultats devraient être similaires à ceux de la méthode de Natt et Herrick (Campbell, 2015b).

L'étude de Tsai et al. menée chez des tortues à tempes rouges (*Trachemys scripta*) évalue une autre méthode de comptage des cellules sanguines : les cellules ont été diluées avec une solution de chlorure de sodium à 0,45% et colorées avec du cristal violet. Les numérations des lignées rouge et blanche ont été établies grâce à un hémocytomètre en utilisant différentes méthodes : la méthode non colorée, la méthode Unopette, la coloration Liu et la coloration au cristal violet. La méthode de coloration au cristal violet a permis l'obtention des meilleurs résultats de coloration et de comptage parmi toutes les méthodes testées ; le coefficient de variance obtenu étant le plus faible. Cette méthode de coloration permet de compter aisément les nombres totaux de leucocytes, d'érythrocytes et de thrombocytes. Cependant, la formule leucocytaire doit être obtenue grâce à un frottis sanguin. D'après les auteurs, cette coloration est simple et rapide à réaliser (Tsai *et al.*, 2014). Le cristal violet étant un réactif peu coûteux et obtenu facilement dans la plupart des laboratoires, cette méthode pourrait être envisagée pour le comptage des cellules sanguines chez les chéloniens. Cependant, la méthode de Natt et Herrick n'a pas été incluse dans cette étude. Il serait donc intéressant de réaliser de nouvelles études comparant les colorations de Natt Herrick et la coloration au cristal violet.

5. Frottis et évaluation qualitative des cellules

a) *Intérêts du frottis*

Le frottis est un examen complémentaire indispensable lors d'analyses hématologiques car il permet l'accès à des informations précieuses dans l'évaluation du patient, à savoir :

- les anomalies morphologiques des cellules sanguines
- la présence d'éléments figurés tels que des parasites ou des bactéries sanguines
- le caractère régénératif d'une anémie par l'observation de réticulocytes

De plus, le frottis est d'autant plus indispensable chez les reptiles qu'il permet d'évaluer la proportion relative des différents leucocytes. En effet, ces proportions ne peuvent pas être obtenues par les automates chez les reptiles en raison du caractère nucléé des érythrocytes et des thrombocytes.

Enfin, dans certains cas le frottis sanguin est le seul examen disponible chez les animaux exotiques en raison du faible volume des échantillons sanguins. Grâce au frottis, de nombreuses informations sont accessibles seulement avec une goutte de sang. Par exemple, l'étude de Keilwerth et al. évalue les outils de diagnostic pour la détection de la maladie du corps d'inclusion (IBD) chez les serpents. L'étiologie de l'IBD est restée longtemps inconnue et la maladie présente des signes cliniques non spécifiques, d'où le besoin d'une méthode de diagnostic spécifique applicable cliniquement. Il s'est avéré que l'examen d'un simple frottis sanguin peut être suffisant pour diagnostiquer l'IBD chez les boas (Keilwerth *et al.*, 2012). Les frottis sanguins constituent donc une technique rapide et non invasive de détection de nombreuses pathologies.

b) *Matériel et réalisation*

Le frottis est simple à réaliser et nécessite classiquement deux lames de microscope propres et dégraissées ou une lame et une lamelle selon la méthode d'étalement utilisée.

L'objectif est de créer une monocouche de cellules dispersées individuellement et permettant une distribution cellulaire reflétant la concentration cellulaire dans le sang.

Il est conseillé de toujours préparer au moins trois frottis sanguins.

(1) *Étalement*

Comme expliqué précédemment, l'usage d'héparine est à l'origine d'une teinte bleuâtre du fond du frottis sanguin et d'une agglutination augmentée des leucocytes et des thrombocytes par rapport à l'EDTA (Jacobson, 2007). Afin d'éviter les artéfacts dus aux anticoagulants, les frottis sont réalisés avec du sang frais sans ajout d'anticoagulant et immédiatement après le prélèvement sanguin (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

Une goutte de sang est placée à l'extrémité de la première lame, à environ 1 cm du bord puis celle-ci est étalée le long cette lame grâce à la deuxième lame ou à une lamelle. Comme chez les mammifères, de multiples techniques d'étalement sont décrites.

L'étude de Perpiñan et al. compare trois méthodes d'étalement de frottis sanguins chez des iguanes verts à savoir : les méthodes coverslip-to-slide technique (technique de lamelle sur lame), bevel-edge slide technique également appelée wedge-spread film technique (technique de glissement biseauté) ou encore la technique slide-to-slide technique (technique de lame sur lame) (*Figure 51*). Il a ainsi été montré que la qualité du frottis est optimisée avec les techniques coverslip-to-slide et bevel-edge slide (Perpiñan *et al.*, 2006).

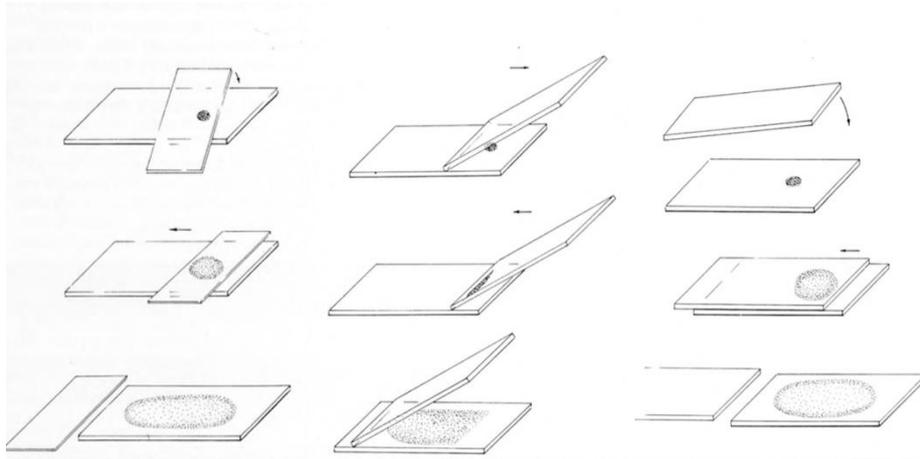


Figure 51 : de gauche à droite, méthode coverslip-to-slide technique, bevel-edge slide technique et slide-to-slide technique (Perpiñan et al., 2006)

Outre la qualité de frottis qu'elle permet d'obtenir, la technique bevel-edge slide est la plus communément utilisée c'est pourquoi nous la détaillerons ci-dessous. Elle peut être réalisée selon deux variantes :

- Technique « en poussant » (Figure 52)

La deuxième lame, faisant office de « lame poussoir », est placée sur la première de manière à former un angle de 30 à 45 ° devant la goutte de sang (Thrall *et al.*, 2012). La deuxième lame est ensuite reculée dans la goutte de sang puis avancée vers l'autre extrémité de la première lame de manière à étaler la goutte de sang d'un mouvement sûr et rapide.

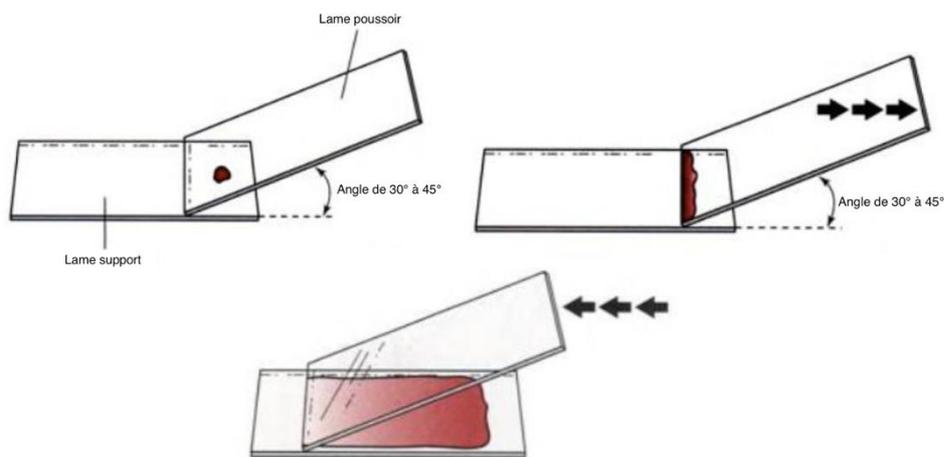


Figure 52 : technique de glissement biseauté par la méthode « en poussant » (Estridge, Reynolds and Walters, 2000)

- Technique « en tirant » :

Les mêmes étapes sont effectuées. Les deux lames forment également un angle de 30 à 45° mais la lame poussoir est orientée dans l'autre sens, c'est à dire vers l'extrémité de la lame opposée à la goutte de sang.

La qualité du frottis sanguin produit par cette méthode d'étalement « par glissement biseauté » dépend de la longueur et l'épaisseur du frottis, eux même dépendants de plusieurs paramètres :

- Le volume de la goutte de sang
- L'angle formé entre les deux lames
- La vitesse à laquelle l'étalement est réalisé

Les anomalies les plus communément rencontrées lors de la préparation de frottis sanguin et les principales causes impliquées sont synthétisées ci-dessous (*Tableau XXI*).

Tableau XXI : principales anomalies rencontrées lors de la réalisation d'un frottis sanguin et causes possibles (Estridge and Reynolds, 2012)

Anomalie rencontrée	Causes possibles
Frottis trop fin ou trop long	Volume de la goutte de sang trop petit Angle entre les deux lames trop petits
Frottis trop épais ou trop court	Volume de la goutte de sang trop grand Angle entre les deux lames trop grand
Présence de vagues sur le frottis	Pression inégalement exercée tout au long de l'étalement Hésitation lors de l'étalement
Présence de trous dans le frottis	Lame support ou lame poussoir malpropres Irrégularité du bord de la lame poussoir

Enfin, il existe également des appareils d'étalement automatique qui produisent des frottis sanguins de bonne qualité chez les humains mais aucune étude n'a été menée chez les reptiles pour comparer les méthodes automatiques et manuelles (Benattar and Flandrin, 1999).

(2) Séchage

Une fois l'étalement de sang réalisé, la lame doit être séchée immédiatement pour éviter les artefacts de séchage. Cela se fait en agitant la lame dans l'air ou en utilisant un chauffe-lame.

(3) Fixation

Après séchage, le frottis est fixé en trempant les lames dans du méthanol dans les 1 à 4 heures après la réalisation du frottis (Divers and Stahl, 2019). Si la coloration May-Grünwald Giemsa est utilisée, la fixation du frottis se fait directement au cours de la coloration.

c) Qualité du frottis

Le frottis doit couvrir environ les trois quarts de la lame et doit montrer une transition progressive avec un corps épais qui se rétrécit jusqu'à une queue fine (*Figure 53*). Idéalement, le frottis a un aspect lisse sans trous visibles et possède un bord à plume, zone où les érythrocytes se touchent, d'environ 1,5 cm de long à l'extrémité fine du frottis (Estridge and Reynolds, 2012).

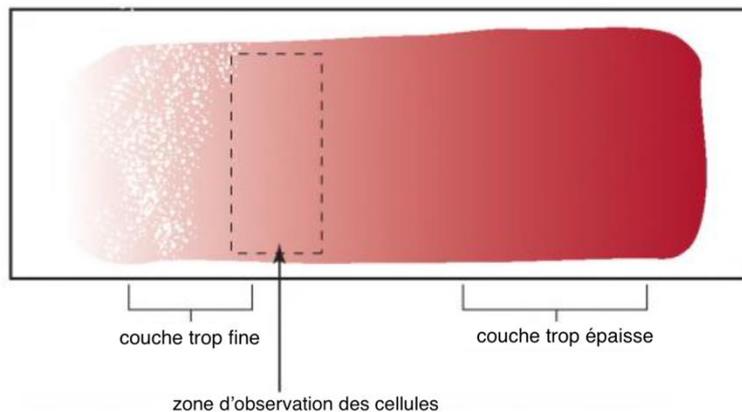


Figure 53 : zone adéquate pour l'observation des cellules sur un frottis sanguin (Estridge and Reynolds, 2012)

Lors de l'examen au microscope, les cellules doivent être réparties uniformément, non regroupées en amas et les érythrocytes ne doivent pas se chevaucher à l'extrémité mince du frottis.

d) Coloration

(1) Choix du colorant chez les reptiles

Chez les reptiles, les lames de frottis sont principalement colorées avec des colorations de type Romanowsky tels que Giemsa, Wright ou May-Grünwald. Ces colorants peuvent être combinés afin de réaliser des colorations de Wright-Giemsa ou May-Grünwald Giemsa. En effet, celles-ci permettent une bonne différenciation des cellules en particulier entre les leucocytes et les thrombocytes (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

Chez les reptiles, la coloration Wright est considérée comme la plus adéquate mais les colorations de Wright-Giemsa et May-Grünwald Giemsa sont également recommandées (Andreani *et al.*, 2014).

La coloration de May-Grünwald Giemsa permet une meilleure différenciation des thrombocytes et des lymphocytes que les autres colorants même si la coloration de Wright permet également une différenciation correcte de ces deux types cellulaires : les thrombocytes possèdent alors un cytoplasme transparent alors que celui des lymphocytes est légèrement bleuté (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004).

Aucune recherche n'a été menée chez la tortue grecque afin de comparer la qualité de ces colorants mais une étude (Andreani *et al.*, 2014) confirme que chez les tortues d'Hermann les cellules sanguines sont plus facilement identifiables avec les colorations de May-Grünwald Giemsa et de Wright qu'avec les colorations rapides.

Les colorations rapides tel que le Diff-Quick sont à utiliser avec précaution car elles peuvent endommager les cellules sanguines, notamment les lymphocytes, et conduire à une sous-coloration des lymphocytes et des érythrocytes immatures (Mader, 2006). Les colorations rapides peuvent également provoquer la formation d'amas d'hétérophiles ce qui complique l'évaluation de ces cellules (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013). Une dégranulation des basophiles causée par ces colorations rapides est également rapportée par certains auteurs (Divers and Stahl, 2019).

Malgré tout, certains auteurs jugent ces kits rapides adéquats d'autant plus qu'ils ont l'avantage d'être faciles d'utilisation et largement disponibles au sein des cliniques vétérinaires.

Enfin, chez les tortues marines, la coloration de May-Grünwald Giemsa est particulièrement adaptée (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

(2) Colorations et principes

La coloration repose sur le fait que les structures cellulaires sont colorées selon leurs affinités pour les colorants acides et basiques. Ainsi, les structures basophiles tels que les noyaux cellulaires attirent les colorants basiques et se colorent en bleu ou violet. Les structures cellulaires acidophiles ou éosinophiles tels que les granules éosinophiles attirent les colorants acides et se colorent en rose-rouge. Les cellules et les structures sont ainsi plus facilement visualisées et différenciées.

(a) Wright

La coloration de Wright est polychrome. Elle contient une combinaison de bleu de méthylène, un colorant basique qui donne une couleur bleue aux structures et de l'éosine, un colorant acide qui donne une couleur rouge-orange aux structures colorées. Cette coloration est couramment employée aux USA (Groulade and Guelfi, 1983).

(b) Giemsa

La coloration de Giemsa est également polychrome. Son composant basique est l'azur de méthylène et son composant acide est l'éosine. Les colorations Wright et Giemsa peuvent être associées ce qui facilite la lecture des frottis chez les reptiles (Andreani *et al.*, 2014).

(c) May-Grünwald

La coloration de May-Grünwald contient du bleu de méthylène, composé basique, et de l'éosine, composé acide (Groulade and Guelfi, 1983). Elle est très souvent associée à la coloration de Giemsa, donnant ainsi une coloration de May-Grünwald Giemsa appelée MGG et permettant une lecture facilitée des lames de frottis chez les mammifères comme chez les reptiles.

(d) Coloration rapide

Forme et intérêts

Les colorants rapides sont disponibles en kit et sont basés sur des colorants hautement concentrés et à haute teneur en alcool ce qui leur permet de pénétrer les membranes en quelques secondes pour colorer les structures cellulaires (Samour *et al.*, 2016). Ces kits contiennent trois flacons : un fixateur comme le méthanol, un colorant rouge comme l'éosine et un colorant bleu comme le bleu de méthylène. Ils fournissent les caractéristiques des colorants Wright-Giemsa et permettent une coloration relativement simple et rapide. Il est souvent plus facile pour un technicien inexpérimenté d'obtenir une teinture adéquate avec une méthode rapide, mais les opérateurs expérimentés peuvent obtenir des résultats supérieurs en utilisant la méthode classique de coloration Wright-Giemsa (Estridge and Reynolds, 2012).

Résultats de la coloration

L'augmentation du nombre de trempages dans la solution d'éosine ou de bleu de méthylène intensifiera la coloration globale du frottis. Ainsi, la coloration éosinophile est intensifiée en augmentant le nombre de trempages dans la solution éosinophile, et la coloration basophile est augmentée par des trempages supplémentaires dans la solution de bleu de méthylène (Campbell, 2015b).

(e) Nouveau bleu de méthylène

Comme expliqué précédemment, les réticulocytes apparaissent comme des érythrocytes polychromatophiles au sein du frottis coloré en coloration de Romanowsky. Cependant, l'évaluation des polychromatophiles est relativement subjective et ces cellules sont difficiles à quantifier (Thrall *et al.*, 2012). La coloration au nouveau bleu de méthylène permet d'identifier aisément les réticulocytes et de compter leur proportion parmi la lignée rouge. En effet, le réticulum des réticulocytes des reptiles se présente sous la forme de précipité cytoplasmique bleu ou d'amas avec cette coloration. Les noyaux possèdent alors un aspect chromatinien et nucléolaire plus distinctif que les colorants à base d'alcool (Campbell, 2015b). Cette coloration est donc souvent utilisée lors d'anémie afin d'évaluer le caractère régénératif de cette dernière (partie 3 II.A.1.b).

Chez les reptiles, les lames de frottis sont classiquement colorées avec des colorations de Romanowsky. Les colorations les plus fréquemment utilisées sont des colorations polychromes telles que celles de Wright-Giemsa ou de May-Grünwald Giemsa. Cependant, un opérateur peu expérimenté est également apte à obtenir des résultats adéquats avec des colorations rapides. Le choix du colorant se fera donc en fonction de l'expérience et des habitudes de l'opérateur.

Enfin, le nouveau bleu de méthylène constitue la coloration de choix pour réaliser un comptage des réticulocytes notamment pour évaluer le caractère régénératif d'une anémie.

e) Évaluation quantitative des types cellulaires et différentiel leucocytaire

(1) Zone de lecture

L'évaluation cellulaire est réalisée dans la zone monocouche, juste derrière le bord à plume du frottis. Il est difficile d'examiner les cellules dans la partie épaisse du film sanguin car elles se superposent et les leucocytes semblent arrondis, ne peuvent pas se dilater et s'aplatir ce qui les fait ressembler à des lymphocytes. L'examen des cellules dans la zone à bord plumeux met en évidence des artéfacts telles que des cellules rompues (Campbell, 2015a).

(2) La formule leucocytaire

La formule leucocytaire correspond aux proportions relatives de chaque type de leucocyte par rapport au nombre total de leucocytes WBC. Comme expliqué précédemment, il est impossible d'obtenir une formule fiable grâce à l'automate chez les reptiles, il faut donc réaliser ce différentiel grâce au frottis sanguin.

Le comptage des différentes populations de leucocyte est obtenu en comptant un minimum de 100 leucocytes rencontrés consécutivement dans la zone monocouche du frottis (Campbell, 2015a). Les cellules sont une à une comptabilisées comme hétérophile, éosinophile, basophile, lymphocyte ou monocyte et, à l'issue de ce comptage, le pourcentage relatif de chaque type de leucocyte est obtenu. Le nombre de chaque type cellulaire est ensuite obtenu selon les règles de proportionnalité grâce au nombre total de leucocytes lui-même obtenu grâce aux solutions de Natt et Herrick ou de phloxine B.

(3) Évaluation subjective de la quantité de leucocytes et de thrombocytes

Le frottis permet d'évaluer subjectivement la quantité de leucocytes et de thrombocytes comme étant faible, normale ou élevée. Cette évaluation ne permet en aucun cas de statuer sur le nombre précis de cellule dans le sang du patient.

L'évaluation subjective de la concentration en leucocytes sur une lame peut être réalisée à faible grossissement (x10 ou x20) par un cytologiste expérimenté. La concentration en leucocytes est considérée comme faible, normale ou élevée avant l'examen des cellules à l'immersion (Campbell, 2015a). Dans le cas où le volume sanguin prélevé ne permet que la réalisation d'un frottis sanguin, le nombre de leucocytes par microlitre peut être estimé en comptant le nombre de leucocytes au sein de 10 champs de lecture puis en multipliant le nombre moyen de leucocytes par champ par un coefficient dépendant de l'objectif utilisé. Ce coefficient varie selon les auteurs ; la formule suivante pourra être utilisée :

Estimation du WBC/ μ L = nb moyen de leucocytes par champ \times grossissement de l'objectif²

Selon d'autres auteurs, le nombre de leucocytes par microlitre peut être estimé en déterminant le nombre moyen de leucocytes par champ grâce à un comptage à l'objectif x40 au sein de 10 champs puis en le multipliant par 2000 (Campbell and Ellis, 2007).

Cette méthode requiert de l'expérience et ne fournit pas un dénombrement leucocytaire précis (Divers and Stahl, 2019). Cependant, l'American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) recommande d'associer cette estimation au comptage manuel réalisé sur l'hémocytomètre et ce dans le but de contrôler la qualité des analyses (Jacobson and Garner, 2020).

Les thrombocytes sont évalués à l'immersion dans l'huile. Leur nombre peut être estimé comme étant faible, normal ou élevé. Chez les reptiles, une moyenne d'un à deux thrombocytes par champ est considérée comme adéquate, ce qui est plus faible que chez les mammifères chez qui les plaquettes sont plus petites (Campbell, 2015a). Si moins d'une à deux plaquettes par champ sont identifiées, cela peut indiquer la présence d'une thrombocytopenie ou d'une agglutination plaquettaire. Cette dernière doit donc être recherchée au niveau du bord à plume du frottis sanguin. Cependant, l'estimation du nombre de thrombocytes par microlitre est à réaliser avec précaution car, comme expliqué précédemment (partie 2 I.B.3), il est parfois difficile de différencier un thrombocyte d'un petit lymphocyte (Divers and Stahl, 2019).

f) Évaluation morphologique des cellules

L'évaluation des cellules sanguines chez les reptiles nécessite de bonnes connaissances et de l'expérience car la distinction entre les types cellulaires n'est pas toujours évidente. Outre un bon dénombrement leucocytaire, l'évaluation de la morphologie cellulaire est essentielle pour détecter les signes de régénération, les réponses inflammatoires ou encore la présence de parasites ou d'inclusions. De plus, certaines de ces altérations cellulaires n'ont aucune signification pathologique : de solides connaissances sont encore une fois essentielles à l'établissement d'un diagnostic.

La morphologie des trois lignées cellulaires est évaluée à fort grossissement au niveau de la zone monocouche (Campbell, 2015a).

(1) Lignée rouge

Pour évaluer l'aspect des érythrocytes, il conviendra d'être attentif aux modifications de la forme cellulaire, aux changements de couleur, à la présence d'inclusions cellulaires mais également aux changements de position du noyau (Campbell, 2015a).

(a) Modifications de la morphologie des érythrocytes

Les érythroplastides sont souvent découverts de manière fortuite : il s'agit d'érythrocytes anucléés et ils sont surtout observés chez les serpents (*Figure 54*).

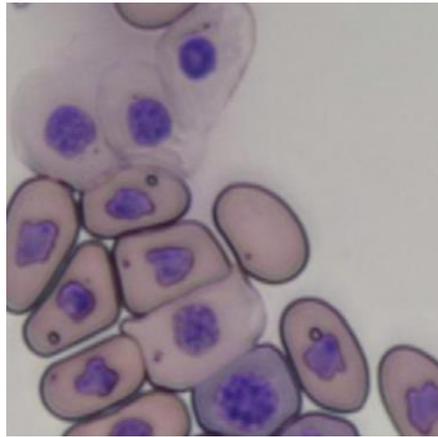


Figure 54 : érythrocyte anucléé chez une vipère amodytes (*Vipera ammodytes*) – coloration rapide Hemacolor (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013)

L'observation d'une légère anisocytose érythrocytaire, c'est à dire d'érythrocytes de taille différente, et d'une légère poikilocytose, c'est à dire d'érythrocytes de forme irrégulière, est considérée comme normale chez la plupart des espèces reptiliennes, surtout en période post-hibernation (*Figure 55*) (Campbell and Ellis, 2007). En revanche, la présence de nombreux poikilocytes, érythrocytes déformés, peut être considérée comme pathologique (secondaire à une anémie, une toxicose, une septicémie) ou artéfactuelle c'est à dire secondaire à un prélèvement ou une préparation de frottis sanguin inappropriés (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

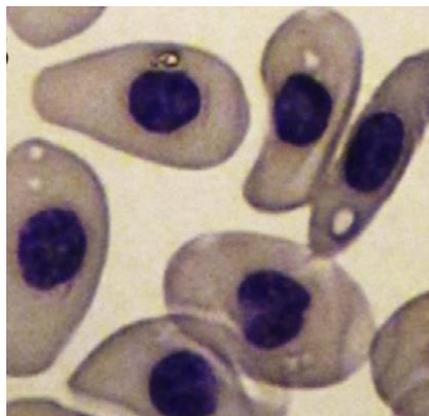


Figure 55 : poikilocytose chez un caméléon casqué du Yémen (*Chamaeleo calypttratus*) – coloration rapide Hemacolor (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013)

Le vieillissement des érythrocytes est remarquable tout d'abord par un gonflement cytoplasmique progressif, puis par le fait que les noyaux s'arrondissent en sphères parfaites, et enfin par une chromatine sombre et dense (*Figure 56*). Ces anciennes cellules sont normalement retrouvées en petit nombre (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).



Figure 56 : érythrocyte ancien chez une tortue grecque - coloration rapide Hemacolor (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013)

Des érythrocytes immatures (*Figure 57*) sont parfois observés dans le sang périphérique des reptiles, en particulier chez de très jeunes animaux ou lors de période de mue. Les érythrocytes immatures sont des cellules rondes à légèrement irrégulières avec un grand noyau rond et un cytoplasme basophile. Contrairement à une cellule mature, la chromatine du noyau n'est pas dense et agglutinée (Campbell, 2015b).

Les variations de la couleur des érythrocytes comprennent la polychromasie et l'hypochromasie. Les érythrocytes polychromatophiles ont une chromatine nucléaire moins dense et un cytoplasme plus basophile que les érythrocytes matures (*Figure 57*) (Campbell, 2015b). Ils sont de taille similaire aux érythrocytes matures et apparaissent comme des réticulocytes lorsqu'ils sont colorés avec des colorants vitaux comme le nouveau bleu de méthylène (Campbell, 2015a). Les érythrocytes polychromatophiles sont souvent considérés comme synonymes de réticulocytes et sont plus fréquents chez les jeunes que chez les adultes (Divers and Stahl, 2019)(Campbell and Ellis, 2007). Leur présence dans le sang est normale mais ils ne doivent pas représenter plus de 2,5 % de la population érythrocytaire (Mader, 2006). En revanche, le degré de polychromasie peut être augmenté physiologiquement en période de mue (Campbell and Ellis, 2007).

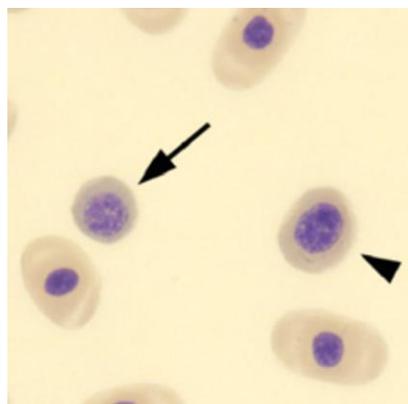


Figure 57 : érythrocyte immature (flèche) et érythrocyte polychromatophile (pointe de flèche) dans le frottis sanguin d'une tortue Émyde peinte de Bornéo (*Batagur borneoensis*) – coloration de Wright-Giemsa (Campbell, 2015b)

Les érythrocytes hypochromatiques sont de couleur anormalement pâle par rapport aux érythrocytes matures. Leur présence en nombre important est témoin d'une carence en fer ou d'une maladie inflammatoire chronique à l'origine d'une séquestration de fer (Campbell and Ellis, 2007).

Des images de mitoses érythrocytaires (*Figure 58*) sont fréquemment observées chez les reptiles, même chez des animaux sains (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004). Elles sont fréquentes lors de maladie inflammatoire sévère, de régénération érythrocytaire ou de malnutrition mais peuvent également être observées en période post-hibernation.

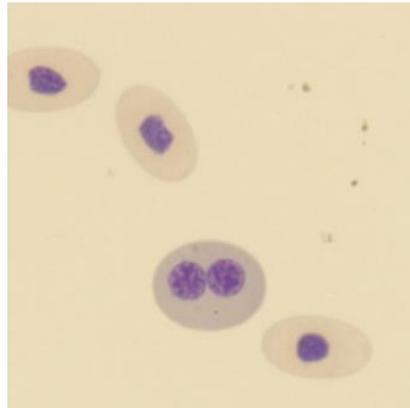


Figure 58 : érythrocyte binucléé chez une tortue émyde à cou rayé commune (*Chinemys reevesii*), coloration de Wright-Giemsa (Campbell, 2015b)

Enfin, l'association d'anisocytose, de poikilocytose, d'érythrocytes immatures et de mitose érythrocytaire est associée à une réponse érythrocytaire régénérative (partie 3 II.A.1.b)(2)).

Les principales anomalies morphologiques des érythrocytes sont synthétisées ci-après (Tableau XXII).

Tableau XXII : principales altérations morphologiques des érythrocytes (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013) (Divers and Stahl, 2019) (Campbell and Ellis, 2007)

Altération	Description	Signification
Erythroplastide	Érythrocyte anucléé	Découverte fortuite, surtout chez les serpents
Anisocytose	Érythrocytes de taille différente	Légère : physiologique
		Sévère : réponse régénérative, maladie inflammatoire sévère, malnutrition, période post-hibernation
Poïkilocytose	Érythrocytes déformés et de forme irrégulière	Légère ou en faible nombre et cellules orientées dans la même direction : artéfact de préparation
		Sévère ou en nombre élevé : anémie, toxicose, septicémie, infections chroniques sévères, période post-hibernation
Polychromasie	Présence de polychromatophiles (souvent considérés comme synonymes de réticulocytes)	Faible nombre (< 2,5 %) : physiologique
		Nombre élevé : témoin d'une régénération lors d'anémie, période de mue
Hypochromasie	Érythrocytes anormalement pâles	Carence en fer ou maladie inflammatoire chronique
Mitose érythrocytaire	Division cellulaire des érythrocytes	Faible nombre : physiologique
		Nombre élevé : réponse régénérative, maladie inflammatoire sévère, malnutrition, période post-hibernation

(b) Inclusions érythrocytaires

Les inclusions cellulaires ne sont pas rares chez les reptiles et peuvent être le reflet d'affections bénignes à mortelles. Ces inclusions sont fréquemment causées par des agents infectieux (Reptarenavirus, Iridovirus, Chlamydiose etc.) ou peuvent correspondre à des organites dégénérés et à des artéfacts de séchage (Divers and Stahl, 2019). Par conséquent, il appartient au praticien de se familiariser avec les inclusions et les artéfacts les plus communs.

(i) *Inclusions cytoplasmiques non infectieuses et artéfacts de séchage*

Comme expliqué précédemment (partie 2 I.C.1.a), des inclusions basophiles rondes sont fréquemment observées dans le cytoplasme des érythrocytes chez de nombreuses espèces de reptile (*Figure 59*). Celles-ci correspondent très souvent à un artéfact lors de la préparation des frottis et ne sont pas considérées comme pathologiques (Campbell and Ellis, 2007). L'étude de ces inclusions grâce à la microscopie électronique suggère qu'il s'agit d'organites dégénérés, comme l'agglutination du réticulum endoplasmique (Campbell, 2015b).

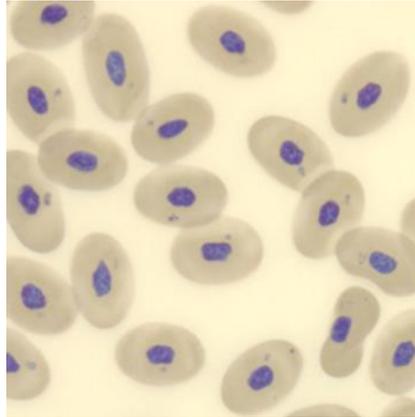


Figure 59 : inclusions basophiles irrégulières dans le cytoplasme des érythrocytes chez une tortue verte (*Chelonia mydas*) - coloration de Wright-Giemsa (Campbell, 2015b)

Des vacuoles cytoplasmiques (*Figure 60*) peuvent également être observées au sein des érythrocytes et sont d'origine artéfactuelle : un séchage trop lent du frottis sanguin en est souvent la cause (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

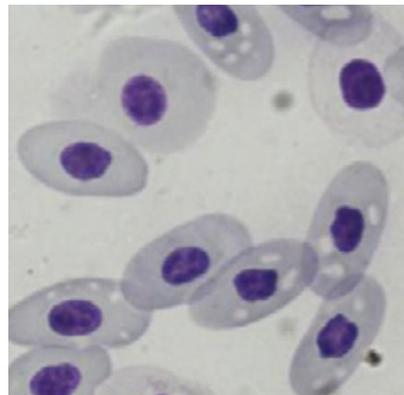


Figure 60 : vacuoles cytoplasmiques d'origine artéfactuelle chez un iguane vert (*Iguana Iguana*) – coloration rapide Diff-Quick (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013)

Un autre type de vacuole intra-érythrocytaire a été observé chez des reptiles atteints d'une maladie inflammatoire et recevant un traitement antimicrobien (*Figure 61*). Ces vacuoles sont retrouvées au sein des érythrocytes matures et immatures du sang périphérique mais également au sein des précurseurs de la moelle. Elles sont de taille variable et certaines d'entre elles contiennent des particules. L'origine de ces vacuoles n'a pas été déterminée mais il semblerait qu'elles soient associées à une septicémie ou à la prise d'antimicrobiens. Lorsque ces vacuoles sont observées, une culture sanguine ou un changement d'antibiotique est conseillé (Jacobson and Garner, 2020).

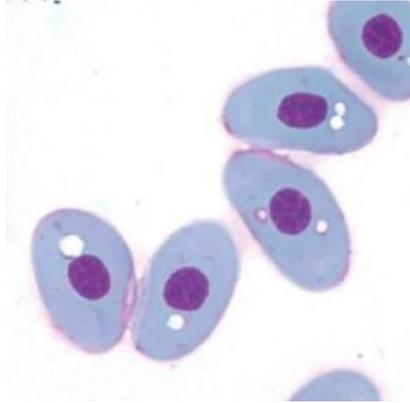


Figure 61 : vacuoles intra-érythrocytaires chez une tortue de Kemp (*Lepidochelys kempii*) (Jacobson and Garner, 2020)

Enfin, d'autres vacuoles érythrocytaires symétriques de couleur claire et de forme carrée, rectangulaire ou hexagonale ont été décrites chez des iguanes en bonne santé. Leur origine et leur signification clinique n'ont pas été déterminées mais ces inclusions ressemblent aux cristaux d'hémoglobine retrouvés chez les mammifères (Jacobson and Garner, 2020).

(ii) Inclusions virales

Chez les pythons et les boas, la présence d'inclusions cytoplasmiques homogènes, légèrement basophiles et de taille variable au sein des érythrocytes (Figure 62), des lymphocytes et des hétérophiles évoque la maladie des corps d'inclusion causée par un Reptarenavirus (aussi appelée IBD) (Campbell, 2015b). Les frottis sanguins suspects peuvent également être colorés avec de l'hématoxyline et de l'éosine qui colorent les inclusions éosinophiles et permettent donc de ne pas confondre les inclusions virales d'IBD avec des organites dégénérés ou des débris cellulaires (Jacobson and Garner, 2020).

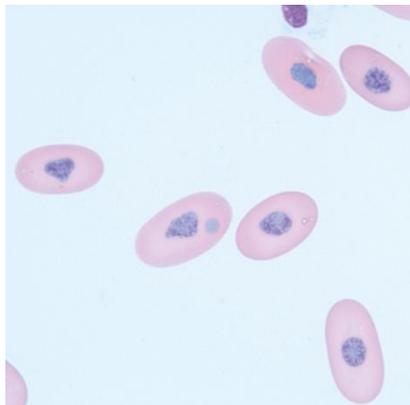


Figure 62 : inclusion cytoplasmique bleutée due à l'IBD au sein d'un érythrocyte chez un python réticulé (*Malayopython reticulatus*) – coloration de Wright-Giemsa modifiée (Divers and Stahl, 2019). Cet animal possédait des lésions histologiques typiques de l'IBD et était positif pour la PCR Reptarenavirus

Des inclusions cytoplasmiques peuvent également être causées par un Iridovirus et correspondent en fait à des particules virales. Décrites chez certains serpents, lézards et tortues, le type de cellule contenant ces inclusions et la morphologie de ces dernières sont très variables selon les espèces. Chez les squamates, les érythrocytes sont atteints tandis que ce sont les monocytes et les hétérophiles chez les chéloniens (Jacobson and Garner, 2020). Chez les lézards, les inclusions cytoplasmiques apparaissent comme de petites structures amorphes roses foncées, ponctuées à rondes. Les infections naturelles n'ont pas été associées à des pathologies

chez les lézards mais les infections expérimentales peuvent quant à elles induire une maladie systémique (Stacy, Alleman and Sayler, 2011). Chez les serpents les inclusions sont de deux types (*Figure 63*) : agrégats ponctués de granules de couleur rose à violet foncé ou inclusions orange pâle à roses, de forme ronde à hexagonale et cristallines. Ce deuxième type d'inclusion est certainement composé de particules virales et de sous-produits lipidiques et protéiques. L'infection chez les serpents est souvent associée à une anémie sévère (Stacy, Alleman and Sayler, 2011). Chez les tortues boîtes (*Terrapene carolina*), espèce de chéloniens chez laquelle ces inclusions ont été observées, cette pathologie s'avère souvent mortelle.

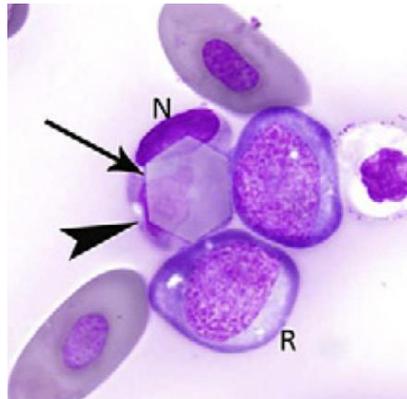


Figure 63 : érythrocyte contenant des inclusions causées par un Iridovirus chez un serpent terciopelo (*Bothrops asper*) – coloration de Wright-Giemsa (Stacy, Alleman and Sayler, 2011). Notez les deux types d'inclusions : inclusion hexagonale cristalline (flèche fine) et inclusions éosinophiles granulaires (flèche large)

Enfin, des inclusions cytoplasmiques basophiles rondes et irrégulières ont été décrites chez le lézard-caïman (*Dracaena guianensis*). Il s'agit de particules virales issues d'un Rhabdovirus mais son importance clinique n'est, à ce jour, pas encore élucidée.

(iii) Inclusions bactériennes

Les inclusions bactériennes sont peu décrites chez les reptiles.

Des bactéries *Anaplasma sp* ont été retrouvées sous la forme d'inclusions intra-érythrocytaires granulaires violettes chez des tortues gaufrées anémiques et sauvages. Cette infection a par ailleurs été confirmée par PCR et les inclusions ont disparu après l'administration de doxycycline (Jacobson and Garner, 2020).

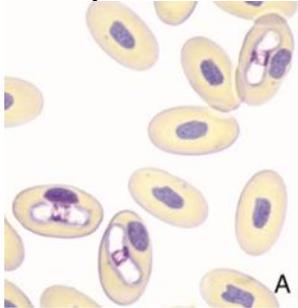
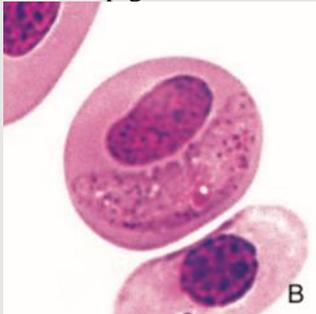
(iv) Inclusions parasitaires

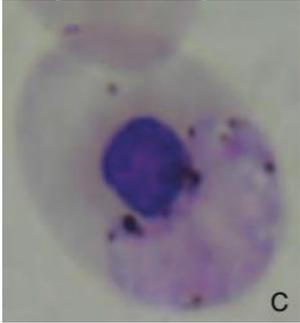
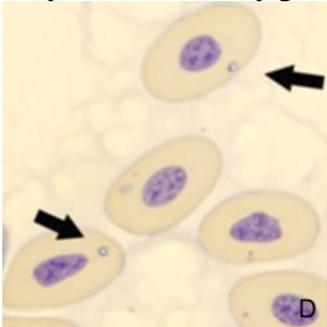
Inclusions cellulaires causées par des hémoparasites chez les reptiles

Les hémoparasites sont fréquemment rencontrés au sein des frottis sanguins de reptiles, surtout chez les individus vivant dans la nature. Ils peuvent être retrouvés sous la forme d'inclusions cellulaires, et c'est à ceux-là que nous nous intéresserons ici, ou libres dans le torrent circulatoire. La plupart d'entre eux sont inoffensifs et constituent une découverte fortuite ce qui contraste avec les hémoparasites des mammifères. Cependant, certains hémoparasites reptiliens sont hautement pathogènes et ont le potentiel pour provoquer des pathologies telle qu'une anémie hémolytique, notamment chez les animaux jeunes ou âgés. Les troubles nutritionnels et le stress environnemental tels que le maintien des reptiles à des températures inadéquates, la surpopulation ou un mauvais assainissement sont des facteurs favorisant le développement de pathologie associée à l'infection parasitaire (Campbell, 2015b).

Les hémoparasites les plus fréquents sont les suivants : *Hemogregarina spp*, *Karyolysus spp*, *Trypanosoma spp*, et les microfilaires *Filarid spp* (Divers and Stahl, 2019). Les principaux parasites sanguins responsables d'inclusions érythrocytaires chez les reptiles et leurs morphologies sont récapitulés ci-après (Tableau XXIII).

Tableau XXIII : récapitulatif des principaux hémoparasites à l'origine d'inclusions érythrocytaires chez les reptiles (Jacobson and Garner, 2020) (Mader, 2006) (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013) (Campbell, 2015b)

Hémoparasite		Espèces touchées	Morphologie	Pathogénie
<p>Haemogregarines (Quatre genres: <i>Hemogregarina</i>, <i>Hepatozoon</i>, <i>Karyolysus</i>, <i>Hemolivia</i>)</p> <p>Genres non différenciables avec précision au frottis d'où l'emploi du terme « hémogregarine »</p>		<p>Squamates, chéloniens, crocodiliens.</p> <p>Absent chez tortues marines</p>	<p>Gamétocyte d'environ 10 µm : inclusion très pâle en forme de saucisse ou de banane contenant des granules bleus à violets. Parfois à l'origine d'un déplacement du noyau cellulaire</p> 	<p>Touche les érythrocytes et parfois les leucocytes Généralement non pathogène chez les espèces d'hôtes naturelles</p> <p>Provoque des inflammations chez les espèces d'hôtes non naturelles</p> <p>Corrélation entre observation d'hémogregarines dans le sang et granulomes hépatiques à <i>Hepatozoon</i> chez un serpent</p> <p>Transmission par tiques, acariens, mouches, insectes, sangsues, moustiques</p>
<p>Plasmodiidae (Genres <i>Plasmodium</i>, <i>Haemoproteus</i>, <i>Saurocytozoon</i>, <i>Fallisia</i> et <i>Haemocystidium</i>)</p>	<p>Genre <i>Plasmodium</i></p>	<p>Squamates et chéloniens</p>	<p>Gamétocyte : rond à ovale, cytoplasme éosinophile pâle, structure rose à bleue contenant des pigments marrons-noirs</p>  <p>Trophozoïte : structure en paquets focaux ou en anneau de chevalière</p>	<p>Touche les érythrocytes, leucocytes et thrombocytes</p> <p>Souvent non pathogène mais anémie hémolytique et infections chroniques possibles</p> <p>Transmission par diptères piqueurs</p>

	<p>Genre <i>Haemoproteus</i></p>	<p>Squamates et Chéloniens</p>	<p>Gamétocyte : rond à ovale, contenant des pigments ressemblant à <i>Plasmodium</i>. Encerclé parfois le noyau cellulaire</p>  <p>C</p>	<p>Touche les érythrocytes</p> <p>Souvent non pathogène mais anémie hémolytique possible</p> <p>Transmission par diptères piqueurs</p>
<p>Piroplasmides (Genres <i>Babesia</i>, <i>Tunetella</i>, <i>Sauroplasma</i> chez lézards et appelé <i>Serpentoplasma</i> chez serpents)</p>	<p>Squamates et chéloniens</p>	<p>Petites inclusions cytoplasmiques de 1-2 µm rondes à piriformes et non pigmentées</p>  <p>D</p>	<p>Touche les érythrocytes</p> <p>Pathogénie inconnue</p> <p>Transmission par insectes piqueurs ou tiques</p>	

A d'après (Mader, 2006) : hémogrégarine, probablement *Hepatozoon*, chez un boa émeraude (*Corallus caninus*) - coloration de Wright-Giemsa modifiée

B d'après (Jacobson, 2007) : érythrocyte contenant un gamétocyte de *Plasmodium giganteum* chez un margouillat (*Agama agama*) – coloration de Giemsa

C d'après (Orkun and Guven, 2012) : gamétocyte mature au sein d'un érythrocyte chez une tortue grecque (*Testudo graeca*) – coloration de Giemsa

D d'après (Campbell, 2015b) : piroplasmide (*Serpentoplasma* spp.) érythrocytaires chez un boa émeraude (*Corallus caninus*), coloration de Wright-Giemsa

Les microfilaires et les trypanosomes sont également des hémoparasites fréquents chez les reptiles mais ils sont libres dans le torrent circulatoire (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004). D'autres hémoparasites sont retrouvés chez les reptiles mais ils n'affectent pas les chéloniens, c'est pourquoi nous ne les détaillerons pas ici.

Inclusions cellulaires causées par des hémoparasites chez les tortues grecques

L'hémoparasite *Hemolivia mauritanica* (Tableau XXIII) a été étudié chez la tortue grecque dans de nombreuses régions d'Europe, d'Afrique et du Moyen-Orient et réalise son cycle par l'intermédiaire de la tique *Hyalomma aegyptium*. L'étude de Široký et al. a montré que le pourcentage d'érythrocytes infectés par *H. mauritanica* était significativement plus élevé chez les adultes ce qui est cohérent avec le fait que les juvéniles étaient très peu infectés par les tiques (Široký et al., 2009).

L'étude de Mihalca et al. s'est intéressée à la prévalence de l'hémoparasite *Hemolivia mauritanica* chez des tortues grecques sauvages en Roumanie ainsi qu'à l'intensité de l'infection c'est à dire le pourcentage de cellules sanguines infectées. Parmi les 45 tortues prélevées, 84,44 % d'entre elles étaient parasitées et l'intensité de cette contamination était de 0,04 % à 13,47 %. Il est primordial de noter que toutes les tortues prélevées étaient cliniquement saines (Mihalca et al., 2008). D'autres études ont permis de déterminer ces prévalences chez les tortues grecques dans d'autres régions comme en Grèce, en Turquie ou en Bulgarie.

Les hémogregarines du genre *Haemogregarina* et *Hepatozoon* ont également été décrites chez les chéloniens (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004).

Chez les chéloniens, l'existence d'une contamination par le protozoaire du genre *Plasmodium* est controversée. Certains auteurs attestent son absence lors de leurs observations, une autre étude décrit un parasite du genre *Plasmodium* chez une tortue léopard tandis qu'une étude menée chez la tortue grecque a montré qu'une infection par *Plasmodium* était visible au frottis et que le test rapide de diagnostic du paludisme humain était positif chez cet individu (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004).

Douze espèces d'*Haemoproteus* ont été décrites chez les chéloniens mais de nouvelles études sont nécessaires pour comprendre leur signification clinique. Les parasites *H. anatolicum* et *H. caucasica* ont également été observés chez les tortues grecques (Orkun and Guven, 2012).

Les piroplasmides du genre *Babesia* sont également décrits chez les chéloniens mais aucune étude n'a été menée chez la tortue grecque (Mader, 2006).

(2) Lignée blanche

Là encore, la morphologie des leucocytes est évaluée à fort grossissement au niveau de la zone monocouche. Les grosses cellules tels que les monocytes et les hétérophiles sont parfois concentrées à la marge du frottis, c'est pourquoi ses bords doivent être examinés (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

(a) Modifications de la morphologie cellulaire

En général, la morphologie des leucocytes fournit une indication fiable sur le statut pathologique. Comme chez les mammifères, la présence de cellules immatures et de cellules toxiques au sein du frottis sont des critères plus fiables pour mettre en évidence une maladie infectieuse que le WBC et le différentiel leucocytaire (Campbell, 2015b).

De plus, l'activation des cellules sanguines induit également des changements morphologiques qu'il est utile de connaître afin de ne pas confondre ces modifications avec des anomalies.

(i) *Hétérophiles*

L'observation de la morphologie des hétérophiles est primordiale lors de suspicion d'inflammation ou d'infection chez un patient. En effet, des changements toxiques peuvent se produire dans la moelle osseuse avant libération des leucocytes dans le sang périphérique d'où l'observation d'hétérophiles toxiques au sein du frottis (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013). Ces derniers présentent une basophilie cytoplasmique accrue, une vacuolisation cytoplasmique et une granulation de forme et couleur anormales (*Figure 64*). La présence d'une lobulation nucléaire chez les espèces de reptiles qui en sont normalement dépourvues est un autre paramètre suggérant une inflammation sévère. Enfin, des hétérophiles dégranulés peuvent représenter des changements toxiques bien qu'il faille écarter les artéfacts associés à la préparation du frottis sanguin (Campbell, 2015b).

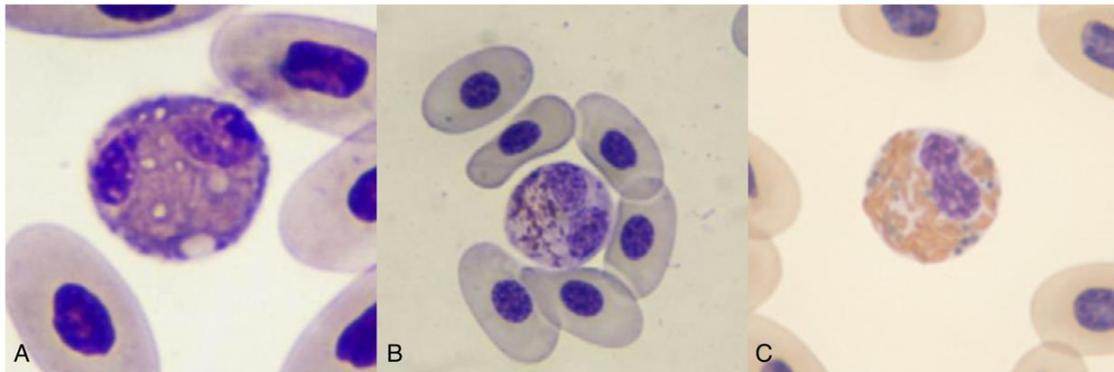


Figure 64 : changements morphologiques au sein d'hétérophiles toxiques chez des reptiles (Campbell, 2015b) (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013)

*A : hétérophile toxique présentant une vacuolisation et une basophilie cytoplasmique marquées chez un iguane vert (*Iguana iguana*) – coloration rapide Diff-Quick*

*B : granules cytoplasmiques anormaux au sein d'un hétérophile toxique chez une tortue d'Hermann (*Testudo hermanni*) – coloration rapide Hemacolor.*

*C : hétérophile toxique possédant un noyau lobulé chez une espèce n'en possédant normalement pas, une tortue-boîte (*Terrapene carolina triunguis*) – coloration non précisée*

L'intensité de cette toxicité cellulaire ainsi que la proportion des cellules atteintes doivent être estimées. Pour cela, des échelles à plusieurs niveaux peuvent être utilisées : l'intensité de la toxicité est estimée de 1+ à 3+ selon si elle est légère, modérée ou marquée, et les cellules atteintes sont qualifiées de rares, peu nombreuses, nombreuses à très nombreuses (Jacobson and Garner, 2020).

Les hétérophiles toxiques sont souvent accompagnés d'un relargage d'hétérophiles immatures. En effet, l'accélération de la production induite par la réponse inflammatoire provoque une libération d'hétérophiles précoces. Comparés aux hétérophiles matures, les hétérophiles immatures sont caractérisés par un grand noyau large, et donc un grand rapport nucléocytoplasmique, et un cytoplasme plus basophile (*Figure 65*) (Jacobson and Garner, 2020).

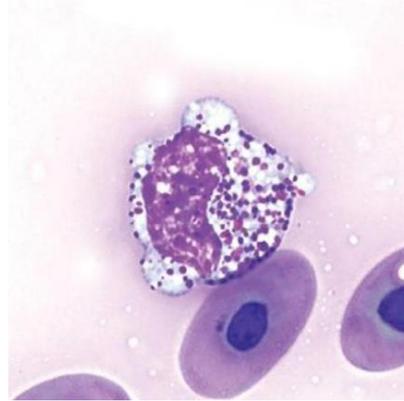


Figure 65 : hétérophile immature toxique chez une tortue grecque (Jacobson and Garner, 2020). Notez le grand rapport nucléocytoplasmique

Rappelons qu'il est primordial d'interpréter ces changements morphologiques en regard de l'aspect clinique du patient et du résultat de l'hémogramme. En effet, lors de pathologies inflammatoires ou infectieuses, ces changements morphologiques sont souvent associés à une hétérophilie (partie 3 II.B.1).

(ii) Éosinophiles

La morphologie des éosinophiles est rarement altérée. Une dégranulation des éosinophiles peut être observée mais elle est très souvent d'origine artéfactuelle et causée par une anomalie de stockage du prélèvement, de préparation du frottis sanguin ou de coloration (Jacobson and Garner, 2020).

Des éosinophiles immatures sont parfois observés au sein du frottis sanguin. Ils contiennent des granules intra-cytoplasmiques ronds, pâles à basophiles mélangés à des granules éosinophiles sphériques (Figure 66) (Jacobson and Garner, 2020).

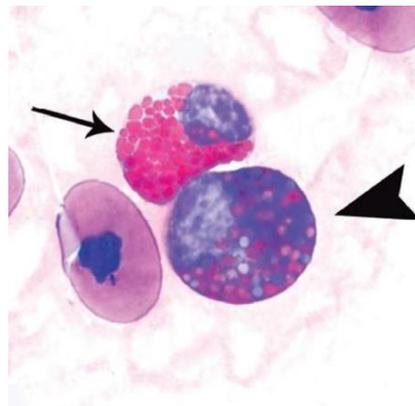


Figure 66 : éosinophile normal (flèche fine) et éosinophile immature contenant des granules éosinophiles et basophiles (flèche large) chez une tortue-boîte (*Cuora galbinifrons*) – coloration de Wright-Giemsa. (Jacobson and Garner, 2020)

(iii) Basophiles

Une dégranulation des basophiles peut être observée au frottis et n'a pas d'incidence clinique. Une coloration inadaptée et une préparation retardée ou inadaptée du frottis en sont fréquemment la cause. Les colorations rapides à base de méthanol comme les colorations Diff-Quick peuvent également être mises en cause (Divers and Stahl, 2019).

(iv) *Lymphocytes*

L'activation des lymphocytes induit des changements morphologiques notables. Les lymphocytes activés sont plus grands et possèdent un cytoplasme plus abondant et basophile que les lymphocytes normaux (*Figure 67*). La chromatine nucléaire est également moins condensée (Campbell and Ellis, 2007). Leur présence au sein du frottis sanguin reflète une stimulation du système immunitaire, c'est pourquoi l'évaluation morphologique des lymphocytes constitue une aide précieuse notamment lors de lymphocytose.

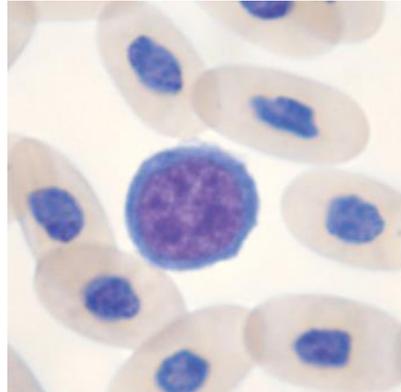


Figure 67 : lymphocyte réactif chez un iguane vert (*Iguana iguana*) - Coloration de Wright- Giemsa (Campbell, 2015b)

Un très faible nombre de lymphocytes immatures possédant une chromatine lisse et un ou deux nucléoles proéminents peut également être observé lors de stimulation antigénique (*Figure 68*) (Jacobson and Garner, 2020).

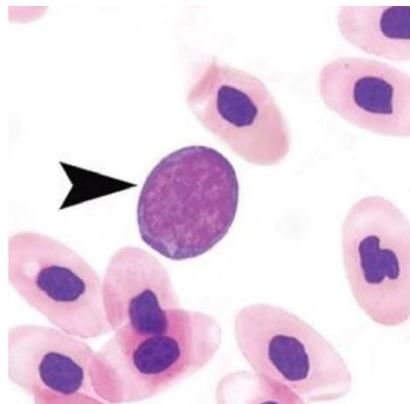


Figure 68 : lymphoblaste chez un iguane vert (*Iguana iguana*) – coloration de Wright-Giemsa (Jacobson, 2007)

(v) *Monocytes*

Les monocytes activés ont également un aspect différent des monocytes normaux. Ils peuvent contenir des vacuoles cytoplasmiques distinctes de taille variable, le noyau peut être rond, ovale ou lobulé et des projections cytoplasmiques sont parfois observées (*Figure 69*) (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

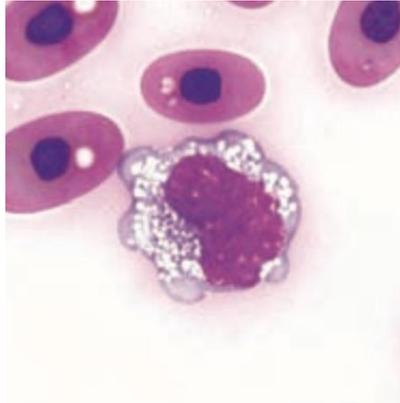


Figure 69 : monocyte activé chez une tortue sillonnée (*Geochelone sulcata*) (Jacobson, 2007). Notez la présence de nombreuses vacuoles cytoplasmiques

La phagocytose d'érythrocytes ([Figure 70](#)) et de leucocytes par les monocytes est possible dans le sang périphérique des reptiles et est parfois associée à une anémie ou à des maladies infectieuses (Campbell, 2015b).

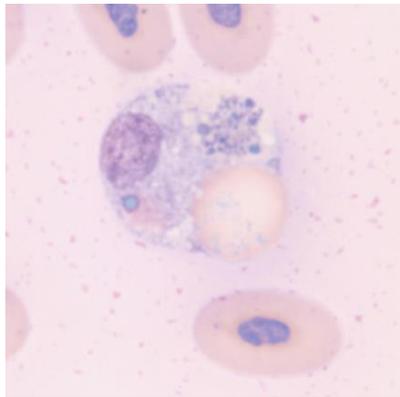


Figure 70 : monocyte en cours d'érythrophagocytose chez un iguane vert (*Iguana iguana*) – coloration de Wright-Giemsa (Campbell, 2015b)

Enfin, des macrophages de morphologie modifiée appelés mélanomacrophages ([Figure 71](#)) peuvent être identifiés dans le frottis sanguin des reptiles. Ils sont souvent le reflet de maladies inflammatoires (Campbell, 2015b).

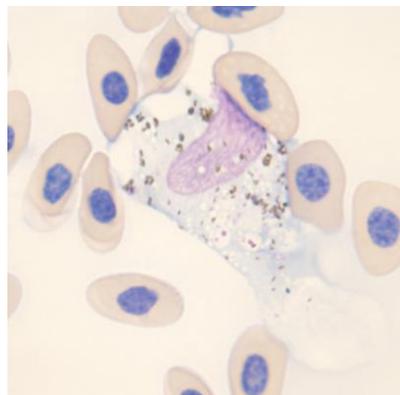


Figure 71 : mélanomacrophage chez un iguane vert (*Iguana iguana*) – coloration de Wright-Giemsa (Campbell, 2015b)

(b) Inclusions leucocytaires

(i) *Inclusions cytoplasmiques non infectieuses*

Des vacuoles claires de taille variable contenant probablement des lipides ou des protéines non spécifiques peuvent être observées au sein des monocytes (*Figure 72*). Ces inclusions doivent être observées attentivement afin de ne pas les confondre avec des inclusions virales (Jacobson and Garner, 2020).

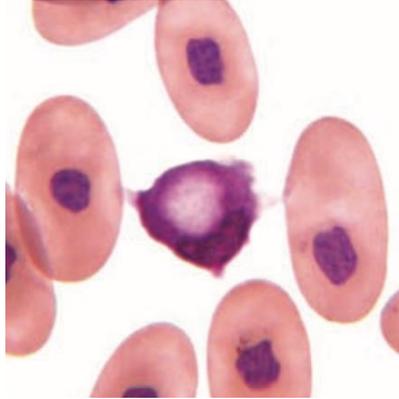


Figure 72 : vacuole contenant probablement des lipides au sein d'un monocyte de boa constricteur (*Boa constrictor*) – coloration de Wright-Giemsa (Jacobson, 2007)

Quelques monocytes circulants contenant de la mélanine (*Figure 73*) ou du matériel cellulaire peuvent également être observés dans le sang périphérique (Jacobson and Garner, 2020). Là encore, le matériel phagocyté ne doit pas être confondu avec des inclusions virales au sein des phagocytes.

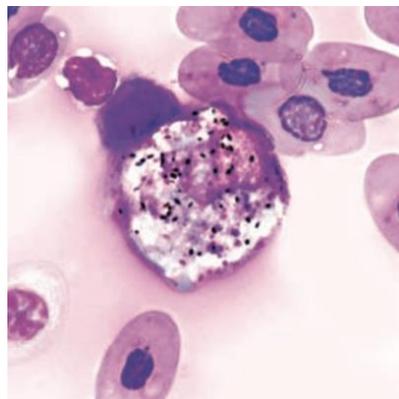


Figure 73 : granules de mélanine au sein d'un monocyte chez une tortue géante des Seychelles (*Dipsochelys dussumieri*) – coloration de Wright-Giemsa (Jacobson, 2007)

Comme expliqué précédemment, une maladie inflammatoire ou infectieuse peut causer des changements toxiques au sein des hétérophiles. Il conviendra donc d'identifier les vacuoles cytoplasmiques ainsi formées et de ne pas les confondre avec des inclusions infectieuses.

(ii) *Inclusions virales*

Comme abordé précédemment, le virus de l'IBD peut causer des inclusions virales au sein des érythrocytes mais également des lymphocytes et des hétérophiles. Ces inclusions sont ovales et basophiles et peuvent envahir presque tout le cytoplasme des lymphocytes. Souvent, elles repoussent le noyau des lymphocytes leur donnant une forme de demi-lune (*Figure 74*) (Jacobson and Garner, 2020).

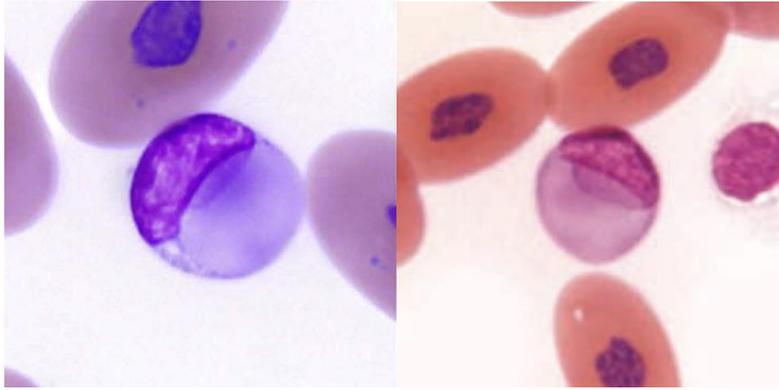


Figure 74 : inclusions homogènes basophiles d'IBD déplaçant le noyau des lymphocytes chez un boa constricteur commun (*Boa constrictor imperator*) – coloration de Wright-Giemsa (Stacy, Alleman and Sayler, 2011) (Jacobson, 2007)

Des inclusions causées par un Poxvirus ont été décrites dans le sang périphérique de caméléons bilobés (*Chamaeleo dilepis*). Il s'agit d'inclusions granulaires, basophiles à violettes et liées à la membrane des monocytes circulants (Figure 75) (Jacobson and Garner, 2020).

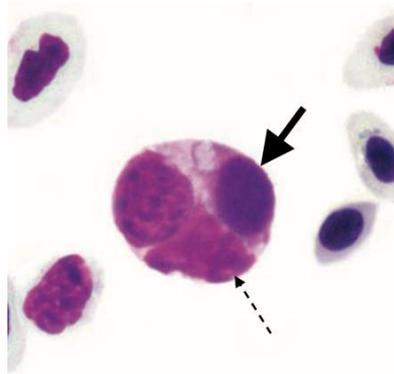


Figure 75 : monocyte contenant une inclusion causée par un Poxvirus (flèche en pointillés) et une causée par Chlamydia (flèche pleine) chez un caméléon bilobé – coloration de Wright-Giemsa (Jacobson, 2007)

Des inclusions virales causées par un Iridovirus ont également été observées au sein des monocytes et des hétérophiles chez une tortue-boîte (*Terrapene carolina*). Ces inclusions de 3 à 7 µm de diamètre sont rondes à ovales, roses et granuleuses (Figure 76). Le virus sous-jacent a été identifié : il appartient au genre *Ranavirus* et provoque une morbidité et une mortalité sévères chez les tortues-boîtes.

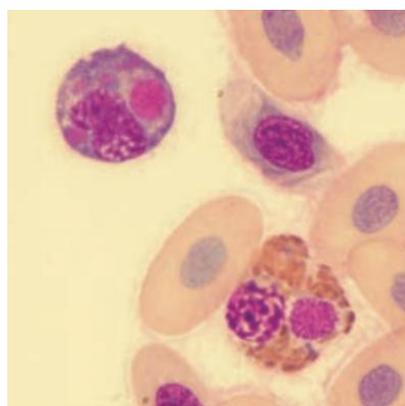


Figure 76 : inclusions rondes, roses et granulaires causées par un iridovirus au sein de leucocytes chez une tortue-boîte (*Terrapene carolina carolina*) – coloration de Wright-Giemsa (Jacobson, 2007)

(iii) *Inclusions bactériennes*

De nombreuses bactéries ont été décrites dans le sang périphérique des reptiles mais nous nous intéressons ici aux inclusions cellulaires d'origine bactérienne et non pas aux bactéries libres dans le torrent circulatoire ou phagocytées lors d'infection bactérienne. Comme chez les mammifères, les phagocytes tels que les monocytes et les hétérophiles phagocytent les bactéries lors d'infection bactérienne : ces images de phagocytose ([Figure 77](#)) doivent donc être identifiées et ne pas être confondues avec une anomalie.

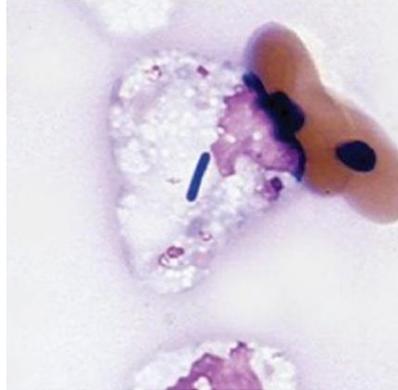


Figure 77 : bactérie phagocytée par un hétérophile toxique au sein d'un frottis sanguin d'alligator américain (*Alligator mississippiensis*) – coloration de Wright-Giemsa (Jacobson and Garner, 2020)

Des inclusions bactériennes causées par la bactérie *Chlamydia pneumoniae* ont été observées au sein d'environ 2 % des monocytes chez des boas émeraudes ([Figure 78](#)). L'infection a par ailleurs été confirmée par un test PCR (Jacobson, 2007).

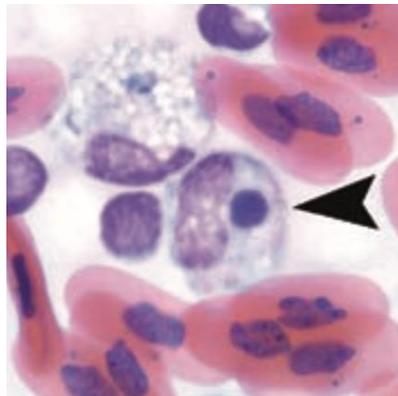


Figure 78 : inclusion causée par la bactérie *Chlamydia pneumoniae* au sein d'un monocyte chez un boa émeraude (*Corallus caninus*) – coloration de Wright-Giemsa (Jacobson, 2007)

(iv) *Inclusions parasitaires*

Comme expliqué précédemment, les leucocytes peuvent, plus rarement que les érythrocytes, contenir des inclusions parasitaires causées par la famille des Plasmodiidae et par les hémogrégarines des genres *Hepatozoon* et *Karyloysis* ([Figure 79](#)) (Mader, 2006).



Figure 79 : monocyte infecté par une hémogrégarine chez un lézard arc-en-ciel (*Ameiva ameiva*) – coloration non précisée (Bonadiman et al., 2010)

(3) Thrombocytes

Les thrombocytes immatures sont plus grands que les cellules matures et leur cytoplasme a une teinte bleuâtre.

Les thrombocytes activés (*Figure 80*) sont courants au sein du sang périphérique et doivent être identifiés. Ils forment des agrégats de cellules de volume cytoplasmique réduit et possèdent des membranes cytoplasmiques irrégulières. Des vacuoles cytoplasmiques, des pseudopodes et des filaments de type fibrine rayonnant autour des cellules peuvent également être présents (Campbell, 2015b).

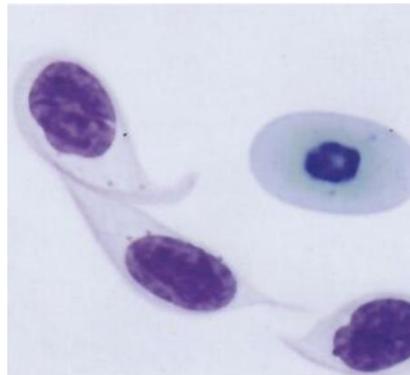


Figure 80 : thrombocytes activés chez une tortue gaufree (*Gopherus polyphemus*) (Campbell and Ellis, 2007)

Des thrombocytes anormaux possédant des noyaux de forme variable peuvent être observés occasionnellement et il semblerait qu'ils soient associés à une maladie inflammatoire sévère ou à une anorexie prolongée (Campbell, 2015b). Des thrombocytes binucléés peuvent également être observés chez des patients anémiques (Jacobson, 2007).

Certains auteurs relatent avoir personnellement observé des inclusions cytoplasmiques d'IBD au sein des thrombocytes (*Figure 81*) (Jacobson and Garner, 2020).

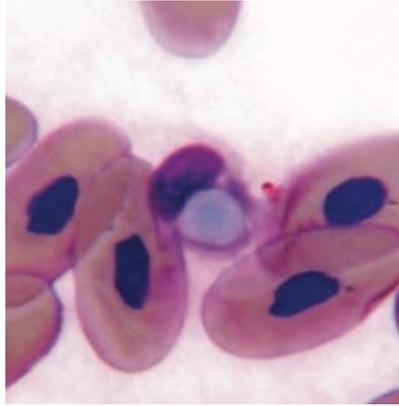


Figure 81 : thrombocyte contenant des inclusions d'IBD chez un boa de la Jamaïque (*Epicrates subflavus*) – coloration de Wright-Giemsa (Jacobson, 2007)

Hormis cela, peu de modifications morphologiques des thrombocytes sont rapportées dans la littérature.

Une analyse hématologique complète nécessite donc d'évaluer de nombreux paramètres quantitatifs mais il est primordial d'évaluer également la morphologie cellulaire ainsi que les inclusions cytoplasmiques. Les différents paramètres à analyser et leurs méthodes de mesure chez les reptiles sont synthétisés ci-après (Tableau XXIV).

Tableau XXIV : récapitulatif des paramètres sanguins, leurs unités dans le système international et leurs méthodes de mesure (Divers and Stahl, 2019) (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013) (Campbell and Ellis, 2007) (Jacobson and Garner, 2020)

PARAMÈTRES QUANTITATIFS			
Paramètre	Unités SI	Méthode standard	Autres méthodes
Lignée rouge			
PCV	%	Microhématocrite	Automate réglé selon l'espèce
RBC	10 ¹² /L	Solution de Natt-Herrick et hémocytomètre (Manuellement ou kit commercial Natt-Herricks-TIC®)	Automate réglé selon l'espèce
Hb	g/dL	Méthode de cyanméthémoglobine	-Réaction d'azide-méthémoglobine (ex : hémoglobinomètre HemoCue® B-Hemoglobin) -Automate
MCV	fL	Calculés à partir du PCV et de l'Hb	
MCH	pg		
MCHC	g/dL		
Proportion de réticulocytes	%	Estimée à partir d'un frottis coloré au nouveau bleu de méthylène	
Lignée blanche			
WBC	10 ⁹ /L	-Méthode semi directe Phloxine B (manuellement ou kit commerciaux Avian Leukopet® ou Eopette®) -Méthode directe Natt et Herrick (manuellement ou kit commercial Natt-Herrick-TIC®)	-Évaluation subjective au frottis -Estimé à partir du frottis (calcul selon le grossissement)
Différentiel leucocytaire	10 ⁹ /L	Comptage des proportions cellulaires au frottis sanguin puis calcul à partir du WBC	
Thrombocytes			
TTC	/μL	Solution de Natt et Herrick et hémocytomètre	-Évaluation subjective au frottis -Estimé à partir du frottis (calcul selon le grossissement)
PARAMÈTRES QUALITATIFS			
Paramètre		Méthode	
Morphologie de tous les types cellulaires		Frottis sanguin coloré avec des colorations de Romanowsky	
Présence d'inclusions cellulaires ou de parasites			

PARTIE 3 : VALEURS HÉMATOLOGIQUES DE RÉFÉRENCE ET ANOMALIES DE L'HÉMOGRAMME CHEZ LES REPTILES ET PLUS PARTICULIÈREMENT CHEZ LA TORTUE GRECQUE

I. Valeurs hématologiques de référence chez la tortue grecque et variations physiologiques

A. Intérêts et limites des analyses hématologiques chez les reptiles

Les indications d'évaluation hématologique chez les reptiles sont nombreuses et similaires à celles des mammifères de compagnie. Classiquement, l'hématologie est utilisée pour détecter des pathologies affectant les cellules sanguines tels que l'anémie, les maladies inflammatoires, les parasitémies ou encore les troubles hématopoïétiques. Il s'agit donc d'une aide précieuse au diagnostic pour le clinicien.

Cependant de nombreuses limites sont à prendre en compte lors de l'interprétation des examens hématologiques. Tout d'abord, du fait du manque de standardisation des méthodes d'analyses, les normes hématologiques physiologiques des reptiles varient selon les références utilisées et donc d'un laboratoire à un autre. En effet, les techniques d'échantillonnage, de manipulation des prélèvements et d'analyse du sang peuvent différer d'où une variation fréquente des références hématologiques (Mader, 2006).

Ensuite, les valeurs hématologiques physiologiques des reptiles varient considérablement par rapport à celles des mammifères domestiques : les conditions environnementales, l'état physiologique, l'âge, le sexe ou encore la nutrition sont autant de facteurs qui influent sur l'hémoگرامme normal des reptiles. Les valeurs de référence hématologiques publiées pour les reptiles ne prennent que rarement ou partiellement en compte ces paramètres alors qu'ils sont susceptibles d'influencer les normes hématologiques.

De plus, au vu de la variation des normes hématologiques selon les espèces, il est évident que de nouvelles études sont nécessaires afin d'obtenir des références pour toutes les espèces de reptiles. Aussi, il a été recommandé d'utiliser un minimum de 97 échantillons issus d'une population de référence pour établir des intervalles significatifs de valeurs physiologiques. Certains auteurs attestent même que, dans l'idéal, un minimum de 120 échantillons est requis (Campbell, 2015b). Les publications concernant l'hématologie des reptiles sont peu nombreuses, et rares sont celles qui établissent des intervalles de référence hématologique à partir de tant d'échantillons. Il convient donc d'être prudent dans l'interprétation des données hématologiques chez les reptiles. Certains auteurs considèrent même que seules des valeurs deux fois plus élevées que les normes physiologiques devraient être considérées comme significatives (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004).

Enfin, bien que coûteux et parfois difficiles à réaliser en pratique, des tests diagnostiques plus spécifiques comme la sérologie, la PCR, ou encore l'histopathologie peuvent être nécessaires pour établir un diagnostic définitif (Divers and Stahl, 2019).

B. Variations physiologiques des valeurs hématologiques

1. Variations intrinsèques

a) *Espèce*

De nombreuses différences hématologiques sont notables entre les espèces de reptiles. Ainsi, les chéloniens possèdent le nombre total d'érythrocytes le plus faible tandis qu'on retrouve le plus élevé chez les lézards. Concernant la lignée blanche, comme déjà cité auparavant, le type cellulaire prédominant parmi les leucocytes est variable selon les groupes de reptiles : chez les chéloniens et les crocodiles, les hétérophiles sont majoritaires tandis que ce sont les lymphocytes chez les iguanes et certains serpents (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

Rappelons qu'il existe également de nombreuses variations morphologiques des cellules sanguines selon l'espèce. Par exemple, comme abordé dans la partie 2 I.C.1.b), les noyaux des éosinophiles sont lobés chez certains lézards alors qu'ils sont ronds à ovales chez la plupart des reptiles.

Au sein du groupe des chéloniens des variations interspécifiques des valeurs hématologiques sont également notables. Par exemple, le nombre de lymphocytes par microlitre est significativement plus élevé chez la tortue étoilée d'Inde (*Geochelone elegans*) que chez trois autres espèces étudiées, à savoir les tortues noires indiennes (*Melanochelys trijuga parkeri* et *Melanochelys trijuga thermalis*) et la trionix à clapet (*Lissemys punctata punctata*) (Dilrukshi, Jayasooriya and Prathapasinghe, 2019). De même, les neutrophiles n'ont pas été observés chez les tortues de Kemp (*Lepidochelys kempii*) alors qu'ils sont communs chez les tortues caouannes (*Caretta caretta*) (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004).

Concernant la tortue grecque, une étude a comparé le PCV moyen obtenu chez quatre espèces appartenant au genre *Testudo* : la tortue grecque (*Testudo graeca*), la tortue bordée (*Testudo marginata*), la tortue d'Hermann (*Testudo hermanni*) et la tortue des steppes (*Testudo horsfieldi*). Aucune différence significative n'a été constatée entre le PCV mesuré chez ces quatre espèces. En revanche, nous ne pouvons conclure sur les autres paramètres hématologiques car ceux-ci n'ont pas été étudiés (Mathes, Holz and Fehr, 2006).

De manière générale, il est donc primordial de se référer aux normes établies au sein de l'espèce prélevée. Malheureusement, les normes hématologiques ne sont pas encore établies chez toutes les espèces de reptiles d'où un biais possible lors de l'interprétation des données.

b) *Âge*

Un article étudie les variations hématologiques en fonction de l'âge en répartissant une population de tortues caouannes (*Caretta caretta*) en cinq groupes de sorte à ce qu'il y ait un écart d'un an d'âge entre chaque groupe. Le PCV et le WBC sont plus faibles chez les jeunes animaux que chez les juvéniles plus âgés. Des variations dans les différentiels leucocytaires selon les âges sont également notables : par exemple, les animaux les plus jeunes ont une proportion de lymphocytes plus faible et une proportion de granulocytes plus élevée que les autres groupes (Rousselet *et al.*, 2013).

Une étude menée chez des tortues mouchetées (*Emydoidea blandingii*) a également montré que les tortues adultes possédaient un nombre de leucocytes et de lymphocytes par microlitre plus faibles que les subadultes et les juvéniles. Le nombre d'hétérophiles par microlitre était également plus faible chez les adultes que chez les juvéniles (Mumm *et al.*, 2019).

Chez la tortue grecque, l'influence de l'âge sur l'hémogramme n'a pas été étudiée.

c) *Sexe*

(1) Chez les reptiles

Chez les chéloniens, et de manière plus générale chez les reptiles, les paramètres de la lignée rouge ont tendance à être plus élevés chez les mâles que chez les femelles. Par exemple, les tortues de Bell (*Kinixys erosa*) mâles ont un PCV et une concentration en hémoglobine significativement plus élevés que les femelles (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004). Cependant, ce n'est pas toujours le cas : à l'inverse, les femelles iguanes vert (*Iguana iguana*) possèdent un PCV et une concentration en hémoglobine plus élevés que les mâles (Campbell and Ellis, 2007). Il existe également des espèces où le genre n'influe pas sur les valeurs hématologiques : chez les tortues vertes (*Chelonia mydas*) aucune différence n'a été notée entre les sexes (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004).

La lignée blanche peut également être affectée par le genre. Ainsi, chez les tortues-boîtes à bord jaune (*Cuora flavomarginata*) les mâles ont une concentration en éosinophiles plus élevée que les femelles et les femelles ont une concentration en monocytes plus élevée que les mâles (Sykes and Klaphake, 2015).

Nous pouvons remarquer, là encore, que l'influence du sexe sur les paramètres hématologiques diffère d'une espèce de reptile à une autre.

(2) Chez la tortue grecque

Chez la tortue grecque, les publications s'intéressant à l'influence du sexe sur les valeurs hématologiques de référence sont parfois contradictoires.

L'étude de Tosunoglu n'a révélé aucune différence significative concernant le nombre de cellules sanguines entre mâles et femelles. Cependant, seulement sept individus ont été pris en compte dans cette étude (Tosunoglu, 2005).

Une autre étude a permis d'analyser le sang de 50 tortues mauresques, 25 femelles et 25 mâles, et a établi des valeurs hématologiques significativement différentes entre les sexes. Les mâles ont un nombre total d'érythrocytes, un PCV et une concentration en hémoglobine significativement plus élevés que les femelles. En revanche, le MCV, le MCH et le MCHC ne sont pas influencés par le sexe (El-Mansoury, Hamooda and Mehdi, 2014).

d) *Activité biologique et statut physiologique*

L'étude de Deem et al. s'intéresse aux variations hématologiques chez des tortues caouannes (*Caretta caretta*) divisées en trois groupes : les tortues en quête de nourriture, celles en nidification et les tortues échouées. Ainsi, chez les tortues échouées le PCV est plus faible, la concentration en lymphocytes est plus élevée et la concentration en monocytes est plus faible que chez les tortues en recherche de nourriture ou en nidification. Chez les tortues en quête de nourriture, on note également une diminution du WBC par rapport aux deux autres groupes (Deem et al., 2009).

L'influence de l'activité biologique sur l'hémogramme n'est pas documentée chez la tortue grecque puisqu'aucune étude n'a été réalisée à ce sujet.

2. Variations extrinsèques

a) Saison et hibernation

(1) Chez les reptiles

La saison, et plus généralement la température environnementale, peut influencer sur l'hémogramme des reptiles. Par exemple, des crocodiles logés dans un environnement à basse température à 28°C pendant dix jours avaient un nombre total de leucocytes et de lymphocytes plus faible que des crocodiles du même âge logés dans un environnement à haute température à 38°C. Ces deux groupes de crocodiles avaient également un nombre différent de leucocytes par rapport à ceux logés à une température adéquate c'est à dire à 32°C (Campbell, 2015b). Chez certaines espèces de reptiles tropicaux, une diminution du nombre de lymphocytes circulants a été observée pendant l'hiver malgré l'absence d'hibernation (Mader, 2006).

Au contraire, certaines espèces de reptile ne sont pas affectées par la saison ou la température : aucune différence de paramètres hématologiques n'a été notée avant et après l'hibernation chez les espèces de serpents tempérés (Campbell, 2015b).

Chez les chéloniens, l'hibernation a une influence sur plusieurs paramètres : le PCV, le WBC et la proportion d'éosinophiles augmentent pendant l'hiver tandis que la proportion d'hétérophiles et de lymphocytes diminuent. Au printemps, à la suite de l'hibernation, ces variations se corrigent pour atteindre à nouveau des valeurs normales (Chitty and Raftery, 2013).

(2) Chez la tortue grecque

L'étude de Lawrence et Hawkey s'intéresse aux variations saisonnières des paramètres hématologiques chez les tortues grecques et les tortues d'Hermann. Ainsi, le RBC, le PCV et la concentration en hémoglobine diminuent entre fin mars et juin puis restent stables jusqu'en octobre. En novembre, une légère augmentation des valeurs est observée puis celle-ci est suivie d'une chute brutale en décembre et d'une augmentation concomitante du MCV (*Figure 82*) (Lawrence and Hawkey, 1986).

Il a été suggéré que cette chute des paramètres de la lignée rouge en décembre pourrait être due à la séquestration des érythrocytes dans le foie et/ou la rate car il ne semble pas y avoir de dilution parallèle des autres composants sanguins (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004). Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu.

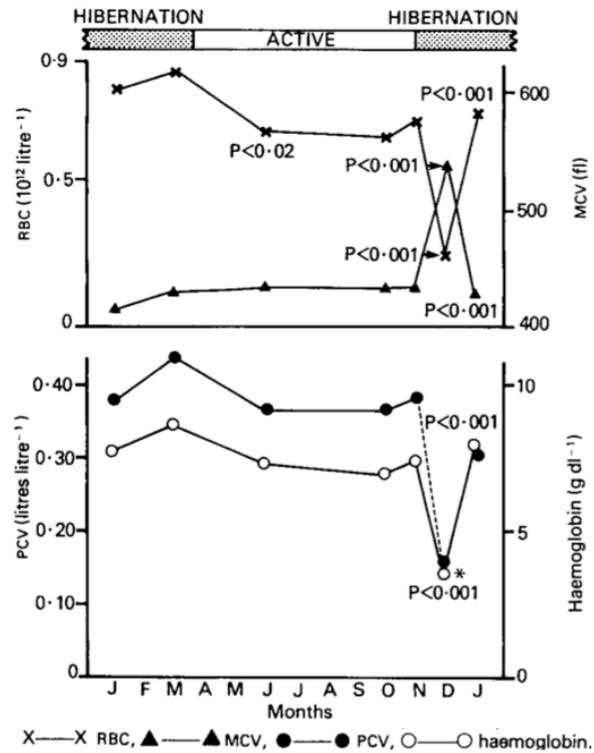


Figure 82 : variations saisonnières des paramètres de la lignée rouge chez des tortues grecques (Lawrence and Hawkey, 1986)

Concernant la lignée blanche, le WBC augmente à l'automne, puis chute pendant l'hibernation et augmente à nouveau pendant l'été. Le différentiel leucocytaire a été réalisé chez un nombre limité de tortues grecques et a montré une diminution de la proportion d'hétérophiles et de lymphocytes entre janvier et mars, une augmentation importante des lymphocytes pendant la période active et une activation éosinophilique en octobre (Figure 83).

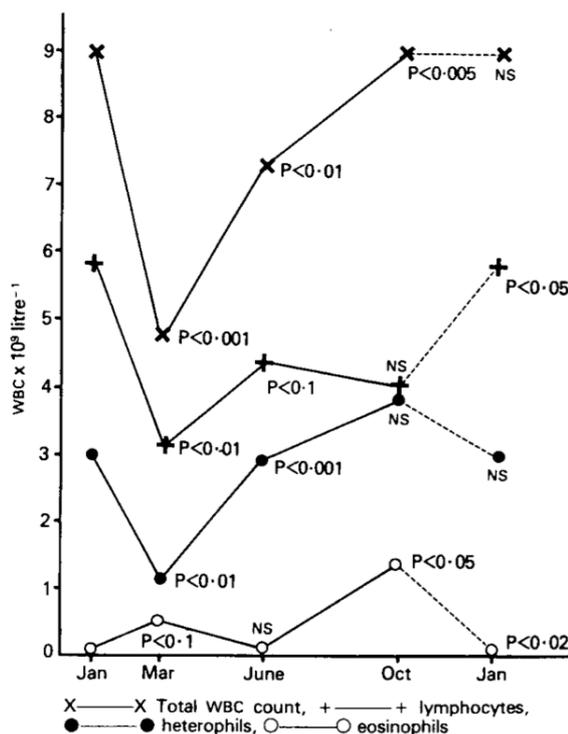


Figure 83 : variations saisonnières du WBC et de la concentration en leucocytes chez des tortues grecques (Lawrence and Hawkey, 1986)

b) Géographie et population

Des différences hématologiques peuvent être observées entre des individus de la même espèce évoluant sous le même climat à la même saison mais dans des aires géographiques différentes. Une étude portant sur des couleuvres géantes (*Thamnophis gigas*) vivant en liberté a mis en évidence que le nombre d'hétérophiles et de basophiles variait d'un endroit à l'autre (Sykes and Klaphake, 2015).

L'influence de la géographie et des populations sur l'hémogramme n'a pas été étudiée chez la tortue grecque.

c) Stress chronique et captivité

Des facteurs de stress chronique comme la captivité, un habitat ou un régime alimentaire inadapté ont également des conséquences sur l'hémogramme (Campbell, 2015b).

Ainsi, les cobras royaux élevés en captivité (*Ophiophagus hannah*) ont des paramètres de la lignée rouge et un nombre de lymphocytes plus élevés, mais un nombre de monocytes et d'hétérophiles inférieur à ceux de cobras royaux capturés dans la nature (Campbell, 2015b).

d) Stress aigu et contention/sédation

Des facteurs de stress aigu comme la capture, la manipulation et la contention lors de la réalisation de la ponction veineuse sont également susceptibles d'affecter l'hémogramme.

Un stress a été induit chez des crocodiles captifs (*Crocodylus porosus*) par deux méthodes différentes : la contention manuelle avec des cordes et l'immobilisation par étourdissement électrique. Les chercheurs ont constaté que les deux groupes de crocodiles présentaient une augmentation significative du PCV et de la concentration en hémoglobine. Cependant,

l'ampleur de cette augmentation a été considérablement réduite et la récupération a été plus rapide chez les animaux étourdis.

Une autre étude a montré que les pythons tapis (*Morelia spilota imbricata*) anesthésiés possèdent un nombre de basophiles par microlitre plus élevé que ceux contenus manuellement (Sykes and Klaphake, 2015).

Chez les chéloniens, une étude menée chez les tortues caouanne (*Caretta caretta*) étudie l'influence du stress causé par la manipulation sur l'hémogramme. Une différence significative du WBC est notable entre les tortues caouannes prélevées immédiatement après avoir été touchées (0 à 3 minutes après le contact) et celles prélevées 10 à 13 minutes après le contact avec l'homme. En revanche, aucune différence significative n'a été observée entre ces deux groupes pour le PCV ou le différentiel leucocytaire (Flower *et al.*, 2015).

Chez la tortue grecque, des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre l'influence du stress sur les paramètres hématologiques.

Les principaux facteurs influençant l'hémogramme sont synthétisés ci-dessous (*Tableau XXV*). Il s'agit de tendances d'influence générales mais que de nombreuses exceptions et spécificités existent.

Tableau XXV : principaux facteurs extrinsèques et intrinsèques affectant l'hémogramme chez les reptiles (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013) (Chitty and Raftery, 2013)

	Espèce	Sexe	Âge	Saison/hibernation
PCV		↑ chez mâles		↑ en hibernation ↓ en été
RBC	↑ chez lézards ↓ chez chéloniens	↑ chez mâles	↑ chez tortues adultes	
WBC				↑ en hibernation ↓ post hibernation chez tortues
% hétérophiles	↑ chez chéloniens et crocodiles			↓ en hibernation ↑ en été
% éosinophiles	Plus grand nombre absolu chez tortues marines, plus petit nombre chez lézards			↑ en hibernation ↓ en été
% basophiles				↓ en hibernation parfois ↑ en période active
% lymphocytes	↑ chez iguanes et certains serpents	↑ chez femelles	↑ chez tortues juvéniles	↓ en hibernation ↑ en été

C. Variations selon le site de prélèvement et la méthode d'analyse

1. Site de prélèvement

Comme expliqué dans la partie 2 II.B.3.e), le risque de contamination lymphatique du sang est présent peu importe le site de prélèvement choisi. Il semblerait toutefois que ce risque soit minoré avec un prélèvement à la veine jugulaire. Cette contamination lymphatique est à l'origine d'une dilution des paramètres sanguins qui peut fausser l'interprétation des données.

De nombreuses études s'intéressent à la survenue de lymphodilution selon le site de prélèvement (partie 2 II.B.3.e)(3)). Par exemple, chez la tortue bordée (*Testudo marginata*), la veine brachiale apparaît comme moins à risque de lymphodilution que la veine coccygienne dorsale (López-Olvera *et al.*, 2003). En revanche, aucune étude comparant les sites de prélèvement n'a été conduite chez la tortue grecque.

2. Méthode d'analyse

Comme citée précédemment, l'étude de Bielli *et al.* compare le nombre total d'érythrocytes et l'hématocrite obtenus par un analyseur de sang semi-automatisé et par méthode manuelle chez des tortues d'Hermann (*Testudo hermanni boettgeri*). Le compteur de cellules à impédance utilisé semblait surestimer le nombre total d'érythrocytes et sous-estimer la détermination de l'hématocrite. Ces différences ont été jugées comme peu susceptibles d'affecter le jugement clinique dans cette étude mais les chercheurs recommandent tout de même que l'utilisation d'un tel équipement soit préalablement validée afin d'obtenir des résultats fiables (Bielli *et al.*, 2015).

La lignée blanche est également largement concernée par l'influence des méthodes d'analyses sur les valeurs hématologiques. Comme expliqué dans la partie 2 II.C.4, une étude menée chez les tortues caouannes compare les méthodes directe de Natt et Herrick et indirecte de l'Eosinophil Unopette® utilisant la solution de phloxine B. Il s'est avéré que le nombre total de leucocytes obtenu par la technique de Natt et Herrick était plus élevé qu'avec le kit Eosinophil Unopette®. De plus, une troisième méthode de comptage utilisant l'oxalate d'ammonium a été utilisée et les résultats obtenus avec cette méthode étaient plus concordants avec les résultats obtenus par la solution de Natt Herrick qu'avec le kit Unopette® (Arnold, 1994). On rappelle cependant que le kit Eosinophil Unopette® n'est plus commercialisé depuis 2007 mais que des kits de remplacement existent.

Ces méthodes de comptage de leucocytes ont également été comparées chez des tortues du Galapagos (*Chelonoidis spp*). Pour cela, une estimation du nombre total de leucocytes a été réalisée à partir de frottis sanguins de bonne qualité. Cela constitue un bon moyen de contrôle pour comparer les résultats des méthodes de comptage manuel. Ainsi, l'estimation du WBC à partir de frottis sanguins a montré une meilleure concordance avec la méthode de Natt et Herrick qu'avec la méthode de phloxine B (Sheldon *et al.*, 2016).

L'étude de Winter *et al.* compare quant à elle deux méthodes de quantification du nombre total de leucocytes chez des tortues boîtes (*Terrapene carolina carolina*). La première méthode comptabilise les leucocytes à l'aide du système Avian Leukopet® utilisant la solution de phloxine B. La seconde estime le nombre total de leucocytes à partir de frottis sanguins : un comptage de leucocyte est réalisé dans 10 champs de la zone monocouche puis le nombre de leucocytes par microlitre est calculé en multipliant le nombre moyen de leucocytes par champ par un coefficient dépendant de l'objectif utilisé. Le comptage à base du système Leukopet® a comptabilisé un nombre total de leucocytes significativement plus élevé que la méthode d'estimation par frottis sanguin. Le différentiel leucocytaire est également différent entre les

deux méthodes. De plus, la concentration en leucocytes était significativement affectée par la classe d'âge pour les deux méthodes, mais l'influence du sexe et de la localisation géographique n'a été objectivée qu'avec le comptage Leukopet®. Ces résultats soulignent l'importance de considérer la méthode de détermination du WBC lors de l'interprétation des résultats d'hématologie reptilienne (Winter *et al.*, 2019).

Selon le même principe, le kit Eosinophil Unopette® et la méthode de comptage par estimation à partir de frottis sanguins ont été comparés chez des tortues Luth (*Dermochelys coriacea*). Le WBC obtenu par le kit Eosinophil Unopette® était significativement plus élevé que celui obtenu grâce aux frottis sanguins (Deem *et al.*, 2007).

Il est donc primordial de prendre en compte la méthode de comptage des leucocytes lors de l'analyse de l'hémogramme. Malheureusement, toutes les méthodes d'analyses n'ont pas été mises en œuvre pour établir des intervalles de référence dans une espèce donnée.

Ici encore, aucune comparaison des méthodes d'analyses n'a été menée chez la tortue grecque.

D. Valeurs connues chez la tortue grecque

Cinq études ont été menées dans le but d'établir des valeurs hématologiques de référence chez la tortue grecque (*Tableau XXVI*). Comme expliqué précédemment, de nombreux paramètres influencent les normes physiologiques chez une espèce donnée. Il conviendra donc de se référer aux normes établies dans le contexte le plus proche des conditions cliniques dans lesquelles le praticien se trouve. La méthode d'analyse doit également être considérée lors de l'interprétation des données. Dans l'idéal, il conviendra également de se référer à une étude dont le nombre d'échantillons utilisés est important.

Tableau XXVI : récapitulatif des études hématologiques menées chez la tortue grecque (Lawrence and Hawkey, 1986) (Tosunoglu, 2005) (Mathes, Holz and Fehr, 2006) (El-Mansoury, Hamooda and Mehdi, 2014) (Ali et al., 2018)

Nom de l'étude – auteurs - année	Nombre d'échantillons	Site de prélèvement	Paramètres étudiés	Méthode de mesure	Remarques
Seasonal variations in haematological data from Mediterranean tortoises (<i>Testudo graeca</i> and <i>Testudo hermanni</i>) in captivity – Lawrence et al - 1986	12 (9 femelles et 3 mâles)	Veine coccygienne ou coupe de griffes	PCV en fonction du site de prélèvement ou en fonction de la saison	Microhématocrite	Prélèvements en janvier, mars, juin, octobre, novembre et décembre
			RBC en fonction du site de prélèvement ou en fonction de la saison	Hémocytomètre et coloration adaptée d'une formule de Natt et Herrick décrite par Frye (1981)	
			Hb en fonction du site de prélèvement ou en fonction de la saison	Hémoglobinomètre	
			VGM, MCH, MCHC en fonction de la saison	Calculés selon formules	
			WBC en fonction de la saison	Hémocytomètre et coloration adaptée d'une formule de Natt et Herrick décrite par Frye (1981)	
			Différentiel leucocytaire pour <i>T. graeca</i> et <i>T. hermanni</i> mélangés (entre 6 et 10 individus selon le mois)	Frottis – coloration de Giemsa	
Hematological values in Hermann's Tortoise (<i>Testudo hermanni</i>) and spur-thighed tortoise (<i>Testudo graeca</i>) from Thrace region (Turkey) - Tosunoglu et al - 2005	5 (sexes non précisés)	Cœur (cardiocentèse)	PCV	Microhématocrite	
			RBC	Hémocytomètre et coloration de Hayem	
			Hb	Méthode de Sahli	
			VGM, MCH, MCHC	Calculés selon formules	
			Différentiel leucocytaire	Frottis – coloration de Wright	

Nom de l'étude – auteurs - année	Nombre d'échantillon	Site de prélèvement	Paramètres étudiées	Méthode de mesure	Remarques
Blood reference values of terrestrial tortoise (<i>Testudo spp.</i>) kept in Germany - Mathes et al -2006	15 (12 femelles et 3 mâles).	Veine coccygienne dorsale	PCV pour l'espèce	Microhématocrite	Tortue en hibernation annuelle. Régime alimentaire herbivore strict
Some blood indexes of the tortoise <i>Testudo graeca</i> Linn., 1758, from Benghazi province, Libya - El-Mansoury et al - 2014	50 (25 femelles et 25 mâles)	Cœur (cardiocentèse)	RBC en fonction du sexe	Hémocytomètre et coloration de Hendrick	
			PCV en fonction du sexe	Microhématocrite	
			Hb en fonction du sexe	Méthode de cyanméthémoglobine	
			VGM, MCH, MCHC en fonction du sexe	Calculés selon formules	
Hematological and parasitological investigation in <i>Testudo graeca</i> (Linnaeus, 1758) tortoise kept in captivity in Egypt – Ali et al - 2018	37 (13 femelles et 24 mâles).	Sinus veineux post-occipital	PCV en fonction du sexe	Microhématocrite	Animaux collectés en animalerie Échantillons collectés entre février et octobre
			RBC en fonction du sexe	Hémocytomètre et coloration de Natt et Herrick	
			Hb en fonction du sexe	Méthode de cyanméthémoglobine	
			VGM, MCH, MCHC en fonction du sexe	Calculés selon formules	
			WBC en fonction du sexe	Hémocytomètre et coloration de Natt et Herrick	
			Différentiel leucocytaire selon statut de bonne santé et quantité d'œufs retrouvés dans les selles	Frottis – coloration de Giemsa	

II. Principales anomalies quantitatives de l'hémogramme et modifications cellulaires associées

A. Lignée rouge

1. Anémie

Les paramètres indicateurs d'une anémie comprennent une diminution du nombre total d'érythrocytes, du PCV et de la concentration en hémoglobine. Le PCV physiologique est d'environ 30 % chez la plupart des reptiles même si nous rappelons qu'il est primordial de se référer aux normes établies chez une espèce donnée. Par conséquent, un PCV inférieur à 20 % suggère la présence d'une anémie chez de nombreuses espèces reptiliennes (Campbell, 2014). L'anémie est une pathologie relativement courante mais elle est peu étudiée et sous-diagnostiquée chez les reptiles (Saggese, 2009).

Chez les reptiles, les vaisseaux lymphatiques longent très souvent les vaisseaux sanguins, c'est pourquoi une contamination lymphatique, et donc une dilution sanguine, peuvent se produire lors de la ponction veineuse. Les échantillons grossièrement contaminés sont facilement identifiables et écartés mais parfois la contamination lymphatique est difficile à évaluer. Cette hémodilution fréquente lors de la collecte de sang reptilien rend le diagnostic d'anémie difficile à établir (Sykes and Klaphake, 2015). De même, des hémolyses peuvent se produire lors de l'utilisation d'anticoagulant inadapté comme l'EDTA chez les chéloniens, lors de ponction veineuse mal réalisée, ou encore en cas de stockage prolongé du prélèvement. Les causes artéfactuelles doivent donc être exclues avant tout diagnostic d'anémie.

Comme chez les mammifères, les anémies sont classées en deux types. L'anémie est dite périphérique ou régénérative lorsque la moelle osseuse maintient sa fonction érythropoïétique et donc que la production et la libération d'érythrocytes nouvellement formés sont maintenues. Au contraire, elle est dite centrale, non régénérative ou encore dépressive lorsqu'une anomalie de formation ou de libération des nouveaux érythrocytes depuis les sites hématopoïétiques se produit.

a) *Étiologies d'une anémie*

(1) Anémie régénérative

Les causes d'anémie régénérative chez les reptiles sont identiques à celles des mammifères et sont donc classées entre hémorragie et hémolyse.

Les causes d'anémie hémorragique sont nombreuses : traumatisme ou perte sanguine liée à une chirurgie, ectoparasite hématophage, trouble de la coagulation, ulcères gastro-intestinaux ou encore néoplasie (Saggese, 2009).

Chez les chéloniens, les hémorragies traumatiques (*Figure 84*) sont causées par des combats entre individus, des morsures de chien ou des chutes. Elles sont extériorisées ou non.



Figure 84 : hémorragie traumatique chez une tortue de Patagonie (*Chelonoidis chilensis*) (Saggese, 2009)

Les ectoparasitoses sévères sont assez fréquentes chez les reptiles. On retrouve ainsi fréquemment des tiques de la famille *Ixodidae* et *Argasidae* (Figure 85). L'introduction d'un nouveau reptile dans une population initialement en bonne santé peut causer une infestation massive par les tiques introduites par le nouvel individu. Les sangsues sont également incriminées chez les reptiles aquatiques même si elles ne sont que rarement retrouvées sur les individus parasités (Saggese, 2009).



Figure 85 : tiques (*Amblyoma argentina*) présentes sur les membres postérieurs et la queue d'une tortue de Patagonie (*Chelonoidis chilensis*) (Saggese, 2009)

Lors d'anémie hémolytique, les érythrocytes sont détruits au sein des vaisseaux sanguins, on parle d'hémolyse intravasculaire, ou à l'extérieur, on parle alors d'hémolyse extravasculaire. L'anémie hémolytique peut être congénitale (anémie hémolytique héréditaire par exemple) ou acquise. Elle peut résulter d'un mécanisme à médiation immunitaire, d'un agent infectieux, d'un médicament ou d'une toxine qui détruit la membrane érythrocytaire.

La cause la plus fréquente d'anémie hémolytique acquise chez les reptiles est une infestation sévère par les hémoparasites responsables du paludisme et appartenant à la famille des Plasmodiidae. Comme abordé dans la partie 2 II.C.5.f)(1)(b)(iv), le genre *Plasmodium* est le plus fréquemment impliqué mais les genres *Haemoproteus* et *Saurocytozoon* peuvent également provoquer une anémie chez les reptiles (Saggese, 2009). L'existence d'une contamination par le protozoaire du genre *Plasmodium* reste toutefois controversée chez les chéloniens.

Des médicaments comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les antifongiques ou encore les sulfamides peuvent également être à l'origine d'une hémolyse. Enfin, les métaux lourds comme le plomb et le zinc peuvent eux aussi induire, en plus de signes cliniques gastro-intestinaux et neurologiques, une anémie hémolytique en cas d'intoxication (Saggese, 2009).

(2) Anémie non régénérative

L'anémie non régénérative est la plus courante chez les reptiles, bien qu'elle soit peu étudiée. Chez les reptiles, le développement d'une anémie non régénérative est un processus lent en raison de la longue demi-vie des érythrocytes qui peut atteindre 600 jours (Saggese, 2009).

Les causes d'anémies dépressives sont nombreuses (*Tableau XXVII*). Elles sont généralement causées par des maladies inflammatoires chroniques et en particulier par des pathologies infectieuses, très répandues chez les reptiles captifs (Mader, 2006). Parmi elles, les infections systémiques chroniques telles que la mycobactériose, la mycoplasmosse, la chlamydie, la salmonellose, l'herpès-virose, l'iridovirose et l'aspergillose sont souvent associées à une anémie non régénérative (Saggese, 2009).

Les pathologies chroniques rénales, hépatiques, spléniques ou pulmonaires sont également des causes fréquentes d'anémie centrale (Saggese, 2009).

- Parmi les troubles rénaux, les néphrites, les amyloses et les calcinose ont été décrites chez les reptiles et peuvent provoquer une anémie non régénérative.
- Concernant le foie, la lipidose hépatique est une pathologie courante chez les lézards captifs et de nombreux agents infectieux sous-jacents ont été décrits. Les tumeurs et les autres troubles hépatiques sont rares mais peuvent également provoquer une anémie.
- Les pneumonies chroniques causées par des infections bactériennes, virales ou mycosiques sont fréquentes chez les lézards, les serpents et les chéloniens, et doivent être investiguées chez un patient anémique.
- Les troubles gastro-intestinaux associés à une diarrhée chronique ou à une inflammation peuvent eux aussi entraîner une anémie centrale.

D'autres causes d'anémie non régénérative observées chez les animaux domestiques peuvent être ajoutées au diagnostic différentiel comme l'hyperoestrogénisme, les calculs urinaires, la goutte, le stress chronique ou encore l'hypothyroïdie (Saggese, 2009).

Les produits chimiques ou encore les néoplasies peuvent également être en cause (Mader, 2006). Ainsi, le lien entre gravité de l'affection tumorale et valeur de l'hématocrite a été étudié chez les tortues vertes (*Chelonia mydas*) dans l'étude de Work et Balazs. Chaque tortue s'est vue attribuer un score subjectif allant de 0 à 3 en fonction de la sévérité des lésions tumorales externes de fibropapillomatose. Il s'est avéré que plus les lésions étaient sévères et plus l'hématocrite était faible (Work and Balazs, 1999).

Enfin, il est primordial de garder à l'esprit qu'un environnement et une alimentation inadaptés peuvent également causer une anémie centrale plus ou moins associée à une hypovitaminose A et une maladie métabolique osseuse (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004)(Saggese, 2009).

Les causes d'anémie centrale sont donc très nombreuses (*Tableau XXVII*), il conviendra ainsi d'adopter une démarche diagnostique rigoureuse afin de trouver l'étiologie d'une anémie.

Tableau XXVII : récapitulatif des principales causes d'anémie chez les reptiles (Saggese, 2009) (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004) (Sykes and Klaphake, 2015)

Causes d' anémie	Artéfactuelle	Lymphodilution (diminution conjointe des autres paramètres) Hémolyse due à l'anticoagulant ou à une méthode de collecte inadaptée (pression négative excessive, manipulation ou stockage prolongé)		
	Physiologique	Sexe : PCV femelles < PCV mâles Variations saisonnières : PCV bas après l'hibernation		
	Pathologique	Périphérique	Hémorragie	Traumatisme Ectoparasitose sévère Coagulopathie Ulcères gastro-intestinaux Néoplasie (hémorragie de tumeur vascularisée)
			Hémolyse	Immunitaire primaire ou secondaire Parasitaire (<i>Plasmodium</i> , <i>Haemoproteus</i> et <i>Saurocytozoon</i>) Toxique (médicament, métaux lourds comme zinc et plomb)
	Centrale	Habitat et alimentation inadaptés Maladie inflammatoire chronique +/- infectieuse (néphrite, lipidose hépatique, pneumonie, troubles gastro-intestinaux, mycoplasmoses, chlamydie, salmonellose etc.) Néoplasie Produit chimique Stress chronique Hyperoestrogénisme Calcul urinaire Hypothyroïdie		

b) Diagnostic d'une anémie

(1) Manifestations cliniques

Les diminutions légères à modérées du nombre d'érythrocytes circulants et de la concentration en hémoglobine ne se manifestent que rarement au niveau clinique. En effet, l'activité restreinte des reptiles implique qu'ils présentent rarement une détresse respiratoire, même lorsqu'ils souffrent d'anémie sévère. Ce n'est que lorsqu'une anémie non régénérative est modérée à sévère et que d'autres signes cliniques liés à la cause d'anémie deviennent évidents, que l'anémie sera cliniquement visible (Saggese, 2009).

Les signes cliniques typiques de l'anémie chez les vertébrés sont la faiblesse, l'intolérance à l'exercice, la réticence à marcher, la tachycardie et la dyspnée. Une pâleur des muqueuses buccales et cloacales peut également être notée bien que ce paramètre soit difficile à évaluer lorsque les muqueuses sont pigmentées. Ces symptômes sont le reflet de la réduction de l'apport en oxygène aux tissus mais du fait des particularités physiologiques et des conditions de captivité des reptiles, ils sont souvent difficiles à identifier (Saggese, 2009).

L'hibernation prolongée, l'anorexie et la léthargie sont également des signes courants mais non spécifiques d'anémie. D'autres symptômes pourraient également être utilisés pour orienter le praticien sur la présence d'une anémie.

L'étude de Cerreta et al. s'est intéressée à la relation entre la couleur des yeux et le PCV chez des tortues-boîtes mâles adultes (*Terrapene carolina carolina*) ainsi qu'à la précision de l'utilisation de la couleur des yeux pour prédire le PCV. Pour évaluer la couleur des yeux chez ces tortues, des cartes composées de différentes teintes de rouge ont été utilisées. Les tortues avec les yeux les plus pâles selon les cartes de notation utilisées avaient systématiquement des PCV plus faibles. Trois types de cartes de couleur ont été utilisées : les cartes à cinq et six teintes avaient une valeur prédictive positive de 100% tandis que la carte à neuf teintes avait une VPP de 71,4 %. Selon les auteurs, cette méthode spécifique et non invasive est cliniquement utilisable pour estimer le PCV chez les tortues-boîtes mâles à la fois en milieu hospitalier et en réadaptation (Cerreta *et al.*, 2018).

(2) Démarche à suivre

Diagnostic de l'anémie

L'étude complète de l'hémogramme est un outil simple et peu coûteux dont dispose le praticien pour diagnostiquer une anémie chez un reptile.

La première étape de la démarche diagnostique consiste à établir le nombre total d'érythrocytes, le PCV et la concentration en hémoglobine du patient. Malheureusement, les valeurs de référence pour ces paramètres ne sont rapportées que pour certaines espèces et ces paramètres sont influencés par des facteurs intrinsèques et extrinsèques. Néanmoins, le nombre total d'érythrocytes chez les chéloniens varie entre 3 et 5 x10⁶ érythrocytes par litre c'est pourquoi l'anémie est avérée lorsque le nombre total d'érythrocytes est bien inférieur à la référence basse. Cependant, rappelons que seuls les cas suffisamment graves atteindront les fourchettes inférieures des références physiologiques. Par conséquent, une interprétation prudente des données est nécessaire.

Recherche étiologique

Comme expliqué précédemment, les anémies chez les reptiles sont d'origine traumatique, dégénérative, inflammatoire, néoplasique, toxique, métabolique, nutritionnelle ou infectieuse.

- Tout d'abord, une anamnèse complète, une évaluation des conditions de vie ainsi qu'un examen physique approfondi sont nécessaires pour rechercher une cause sous-jacente.
- Le calcul des index érythrocytaires peut aider à caractériser une anémie. La mesure du volume glomérulaire moyen permet de différencier une anémie microcytaire (VGM diminué), normocytaire (VGM normal) ou macrocytaire (VGM augmenté). Une caractérisation supplémentaire de l'anémie est réalisée en mesurant la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine : elle permet de déterminer si l'anémie est hypochrome (TCMH diminué) ou normochrome (TCMH normal).

Les anémies chez les reptiles sont généralement normocytaires et normochromes. Les anémies hypochromes sont plus rares et généralement associées à une carence en fer (elle-même causée par une perte excessive de fer due à la séquestration par des bactéries, par une alimentation pauvre en fer ou par une absorption incomplète du fer), à une intoxication aux métaux lourds ou à une malnutrition. Une légère anémie hypochrome peut également être observée en sortie d'hibernation. Les anémies microcytaires et macrocytaires sont quant à elles peu décrites chez les reptiles.

- La couleur du plasma peut également nous orienter sur l'étiologie de l'anémie. Le plasma est de couleur jaune clair à orange chez les reptiles mais peut également avoir une teinte verdâtre. Un plasma rougeâtre est plutôt en faveur d'une étiologie hémolytique. Néanmoins, il conviendra d'écarter les aléas techniques qui peuvent entraîner une hémolyse. Au contraire, une anémie associée à un plasma de couleur normale est plutôt en faveur d'une hémorragie (Saggese, 2009).
- La réalisation de frottis sanguins est indispensable pour évaluer la morphologie des érythrocytes, la présence d'hémoparasites ainsi que la présence de réticulocytes et donc le caractère régénératif d'une anémie. En effet, le nombre de réticulocytes reflète la capacité de la moelle osseuse à produire de nouvelles cellules sanguines.

Les réticulocytes sont facilement identifiés et comptés manuellement lorsqu'ils sont colorés avec des colorants comme le nouveau bleu de méthylène. Chez la plupart des reptiles, le pourcentage normal de réticulocytes est inférieur à 2,5 %. Une augmentation évidente du nombre de réticulocytes est donc un indicateur d'anémie régénérative. Attention cependant lors de l'interprétation car du fait du temps de renouvellement des érythrocytes très lent chez les reptiles, l'augmentation du taux de réticulocyte n'est pas observable lors des premiers stades de l'anémie hémolytique ou hémorragique. De même, le diagnostic d'une anémie non régénérative ne doit pas être hâtif car les érythrocytes nouvellement formés peuvent être observables seulement deux mois après le début de la pathologie (Saggese, 2009).

Comme expliqué au sein de la partie C.5.f)(1)(a), les réticulocytes apparaissent comme des érythrocytes polychromatophiles en coloration de Romanosky (*Figure 86*) et il est admis qu'une élévation du pourcentage d'érythrocytes polychromatiques est un bon indicateur de la régénération. A l'inverse, une absence de polychromasie suggère une anémie non régénérative. Physiologiquement, on considère que jusqu'à 1 % des érythrocytes circulants sont polychromatiques. Une évaluation de plus de 500 érythrocytes peut être nécessaire pour estimer avec précision le statut de la polychromasie chez un reptile.

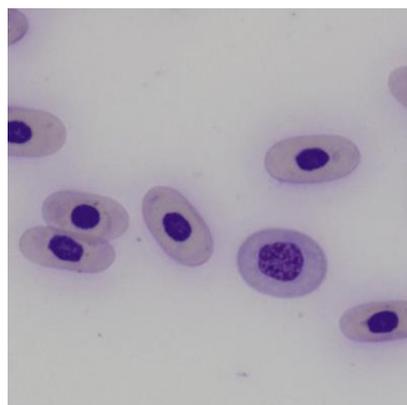


Figure 86 : érythrocyte polychromatique chez une tortue-boîte (*Terrapene carolina triunguis*) - Coloration de Wright-Giemsa (Campbell, 2014)

Les autres signes observables d'une régénération sont la mitose érythrocytaire, l'anisocytose (*Figure 87*), l'anisocaryose et la présence d'autres érythrocytes immatures (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013) (Campbell, 2014). L'absence de réticulocytes, de polychromasie et de figures mitotiques est généralement un bon indicateur d'anémie non régénérative. Cependant, étant donné qu'un faible nombre de réticulocytes et d'érythrocytes polychromatiques sont présents dans le sang des reptiles en bonne santé, un clinicien ne peut utiliser l'absence de ces cellules comme outil diagnostique certain. Là encore, il s'agit de valeurs de référence générales, par conséquent, une interprétation soigneuse de ces paramètres est nécessaire (Saggese, 2009).

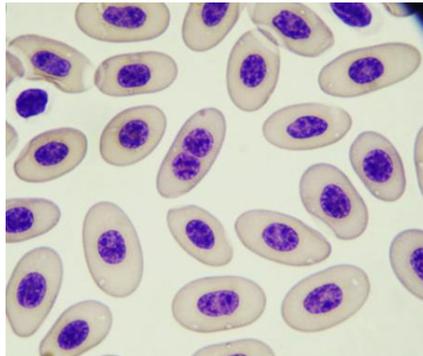


Figure 87 : anisocytose et érythrocyte binucléé en faveur d'un mécanisme régénératif chez une tortue d'Hermann anémiée (*Testudo hermanni*) – coloration rapide Hemacolor (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013)

La présence d'hétoparasites doit également être recherchée par observation du frottis et comme expliqué au sein de la partie 2 C.5.f(1)(b)(iv), il est primordial de ne pas confondre les hétoparasites pathogènes avec les non pathogènes comme les hémogrégarines. Cela est parfois difficile à évaluer car des parasites la plupart du temps non pathogènes comme les protozoaires du paludisme peuvent tout de même causer des anémies hémolytiques (Mader, 2006).

- Enfin, des examens complémentaires plus spécifiques peuvent également être réalisés afin de trouver la cause de l'anémie : tests fécaux, radiographie, échographie, analyse d'urine, analyse biochimique sanguine, culture bactérienne ou fongique, recherche PCR, biopsie, laparoscopie, lavage pulmonaire ou bronchique etc.
- Dans le cas où l'étiologie de l'anémie n'a pu être établie grâce à ces informations, une ponction de moelle osseuse est alors nécessaire pour rechercher un dysfonctionnement ou une infiltration médullaire (Saggese, 2009).

2. Polycythémie ou polyglobulie

Tout d'abord, chez de nombreuses espèces de reptile, les mâles ont physiologiquement un PCV plus élevé que les femelles.

La plupart des reptiles sont considérés comme polycythémique lorsque le PCV est supérieur à 40 %. La polyglobulie est souvent une conséquence de la déshydratation causée par l'hibernation ou une période de sécheresse au cours de laquelle un reptile peut ne pas boire pendant des semaines voire des mois (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013). Une pathologie rénale ou gastro-intestinale peut également être à l'origine de cette déshydratation (Divers and Stahl, 2019). La concentration en hémoglobine et le nombre total d'érythrocytes sont également sensibles aux variations saisonnières (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

Les causes de polyglobulie sont synthétisées ci-dessous (*Tableau XXVIII*).

Tableau XXVIII : récapitulatif des principales causes de polyglobulie chez les reptiles (Divers and Stahl, 2019) (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013)

Causes de polyglobulie	Physiologique	Sexe : PCV mâle > PCV femelle Hibernation (déshydratation)
	Pathologique	Déshydratation : période de sécheresse, conditions de vie inadaptées, pathologie rénale ou gastro-intestinale

B. Lignée blanche

Leucocytose

Une leucocytose peut être le reflet d'une inflammation, d'une infection ou d'un stress. Chez les reptiles, une infection est difficile à diagnostiquer sur la base d'un seul leucogramme car elle peut se manifester par une leucopénie, une leucocytose et même un leucogramme normal (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013). En effet, une étude s'intéressant au siadénovirus chez les tortues de Forsten (*Indotestudo forsteni*) a montré que l'hémogramme des animaux atteints révélait une anémie, une leucopénie ou une leucocytose, une hétéropénie ou une hétérophilie, une lymphopénie ou une lymphocytose, d'où la diversité des atteintes hématologiques pour une même affection (Sykes and Klaphake, 2015). Les variations leucocytaires causées par une infection fongique, bactérienne, virale, parasitaire ou par un stress ont été peu étudiées chez les reptiles. Par conséquent, la littérature nous fournit seulement quelques rapports entre le nombre de leucocytes par microlitre et ces affections. De nouvelles études sont donc nécessaires pour comprendre davantage les variations hématologiques de la lignée blanche (Divers and Stahl, 2019). Enfin, il semblerait qu'étudier la variation du WBC au fil du temps chez un individu serait plus utile que de réaliser une mesure ponctuelle.

Malgré cela, les paramètres les plus importants à interpréter au sein de la lignée blanche sont la morphologie des leucocytes et le différentiel leucocytaire plutôt que le nombre total de leucocytes (Sykes and Klaphake, 2015). En effet, chez de nombreuses espèces, l'inflammation causée par une infection, un traumatisme ou une néoplasie peut être plus susceptible de provoquer une variation dans les pourcentages de leucocytes plutôt qu'une augmentation du nombre total de leucocytes (Divers and Stahl, 2019). Par exemple, dans une étude menée chez les tortues vertes (*Chelonia mydas*) atteintes ou non de dermatite ulcéreuse, aucune différence n'a été observée entre le nombre total de leucocytes des deux groupes mais le rapport hétérophiles/lymphocytes était significativement augmenté chez les tortues malades (Sykes and Klaphake, 2015).

Ainsi, la leucocytose, bien que décrite, se produit moins fréquemment chez les reptiles que chez les oiseaux ou les mammifères (Divers and Stahl, 2019).

Leucopénie

Bien qu'une pathologie infectieuse puisse causer une diminution du nombre total de leucocytes, les causes de leucopénie ne sont que rarement explicitées dans la littérature. Une leucopénie causée par une toxicose associée au fenbendazole a été décrite chez des tortues d'Hermann (Sykes and Klaphake, 2015).

1. Hétérophile

a) Hétérophilie

Une hétérophilie peut être observée lors de stress, de néoplasie, de traumatisme voire de leucémie hétérophilique (Campbell, 2014). Cependant, elle reflète très souvent un état inflammatoire plus ou moins infectieux. En effet, lors de maladies inflammatoires sévères, en particulier celles associées à une étiologie bactérienne, les reptiles développent souvent une leucocytose et une hétérophilie marquée avec la présence de nombreux hétérophiles immatures (Campbell, 2015b). Cependant, l'absence d'hétérophilie ne permet en aucun cas d'affirmer l'absence de maladie infectieuse (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004).

Il est toujours intéressant d'observer la morphologie de ces cellules lorsqu'une hétérophilie est notée. En effet, des signes de toxicité hétérophile ([Figure 88](#)) peuvent être observés lorsque des maladies inflammatoires sont présentes, en particulier celles impliquant des agents infectieux telles que des bactéries. Les principaux signes de toxicité comprennent une basophilie cytoplasmique accrue, une vacuolisation du cytoplasme et une modification de l'aspect des granulations voire une dégranulation (Campbell, 2015b). Lors d'hétérophilie, il est donc primordial de rechercher la présence d'hétérophiles toxiques et d'hétérophiles immatures au sein du frottis. La morphologie détaillée de ces cellules est décrite au sein de la partie 2II.C.5.f)(2)(a)(i).

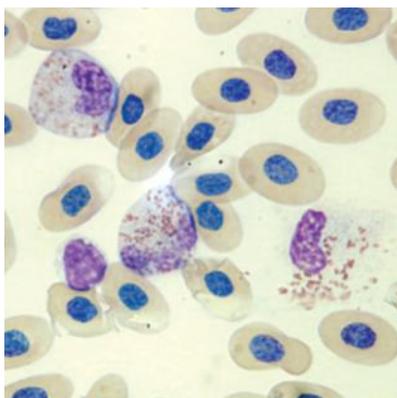


Figure 88 : hétérophiles toxiques chez un iguane vert (*Iguana iguana*) (Campbell, 2015b)

Enfin, rappelons que le taux d'hétérophiles est également influencé par la saison et augmente donc physiologiquement au cours de l'été.

b) Hétéropénie

Une inflammation peut également être à l'origine d'une hétéropénie lorsque l'état général de l'animal est mauvais ou lors d'infection aiguë sévère entraînant une demande excessive d'hétérophiles au niveau tissulaire (Chitty and Raftery, 2013)(Jacobson and Garner, 2020). Par exemple, le nombre moyen d'hétérophiles et d'éosinophiles en phase aiguë d'une épidémie de stomatite-blépharite chez des tortues des steppes (*Testudo horsfieldi*) était de $1,3 \times 10^9/L$ contre $2,8 \times 10^9/L$ après guérison (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004).

L'observation d'hétérophiles immatures au frottis associée à une hétéropénie est le signe d'une réponse inflammatoire écrasante qui est probablement liée à une étiologie infectieuse (Campbell, 2015b). Des hétérophiles toxiques peuvent également être présents (Jacobson and Garner, 2020).

Enfin, la proportion d'hétérophiles est réduite physiologiquement lors de l'hibernation chez les reptiles.

Les causes d'hétéropénie et d'hétérophilie sont récapitulées ci-dessous (*Tableau XXIX*).

Tableau XXIX : récapitulatif des principales causes d'hétérophilie et d'hétéropénie chez les reptiles (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004) (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013) (Campbell, 2015b)

Causes d'hétérophilie	Physiologique	Variations saisonnières (été)
	Pathologique	Infection ou inflammation Traumatisme Stress Nécrose tissulaire Néoplasie Leucémie hétérophilique
Causes d'hétéropénie	Physiologique	Hibernation
	Pathologique	Infection ou inflammation

2. Éosinophile

La concentration en éosinophiles est également influencée par des facteurs intrinsèques et extrinsèques (*Tableau XXX*) tels que les changements environnementaux et saisonniers : la proportion d'éosinophiles est généralement plus faible pendant l'été et plus élevée pendant l'hibernation (Campbell, 2015b).

L'éosinophilie peut être associée à des infections parasitaires et à une stimulation du système immunitaire (Campbell, 2015b). Chez les chéloniens, l'éosinophilie est davantage en faveur de parasitisme chez certaines espèces comme les tortues du désert, les tortues d'eau ainsi que les tortues-boîtes. Cependant, la corrélation entre l'intensité de l'éosinophilie et la charge parasitaire reste variable (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004). Des cas de pancréatites associées à une infection par un helminthe (*Serpinema microcephalus*) ont été diagnostiqués chez trois tortues de Floride à tempes rouges (*Trachemys scripta elegans*) et le profil sanguin de l'une des trois tortues a révélé une éosinophilie (Hidalgo-Vila *et al.*, 2011).

Tableau XXX : récapitulatif des principales causes d'éosinophilie et d'éosinopénie chez les reptiles (Campbell, 2015b) (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004) (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013)

Causes d'éosinophilie	Physiologique	Variations saisonnières (hiver), surtout si hibernation
	Pathologique	Parasitisme Inflammation (plus rare)
Causes d'éosinopénie	Physiologique	Variations saisonnières (été)
	Pathologique	Non décrit

3. Basophile

Chez les chéloniens, une basophilie peut être observée au printemps par rapport à l'été ou plus généralement pendant les périodes actives par rapport à l'hibernation.

Une activation de la réponse immunitaire peut également entraîner une basophilie : par exemple, une augmentation du nombre de basophiles par microlitre a été observée chez des tortues méditerranéennes souffrant d'inflammation du tractus respiratoire supérieur (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004). Des infections érythrocytaires de l'hème causées notamment par les hémoparasites ou par l'iridovirus peuvent également causer une basophilie (Divers and

Stahl, 2019). Enfin, du parasitisme intestinal doit également recherché lors de basophilie chez les chéloniens (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004).

Les causes de variations de la concentration en basophiles sont récapitulées ci-dessous ([Tableau XXXI](#)).

[Tableau XXXI](#) : récapitulatif des principales causes de basophilie et de basopénie chez les reptiles (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004) (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013) (Divers and Stahl, 2019)

Causes de basophilie	Physiologique	Variations saisonnières (période active, printemps)
	Pathologique	Réaction immunitaire
		Infection hémique (ex : hémoparasite, iridovirus) Parasitisme intestinal
Causes de basopénie	Physiologique	Hibernation
	Pathologique	Non décrit

4. Lymphocyte

a) *Lymphocytose*

Comme expliqué précédemment, la concentration en lymphocytes est influencée par de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques comme la saison, l'âge et le sexe ([Tableau XXXII](#)). Ainsi, le nombre de lymphocytes a tendance à être diminué en hiver, qu'il y ait hibernation ou non, et plus élevé en été. La lymphocytose se produit également pendant les périodes de mue (Campbell, 2014). Les femelles et les juvéniles de certaines espèces ont respectivement des proportions de lymphocytes significativement plus élevées que les mâles et les adultes (Campbell, 2015b).

Les pathologies fréquemment à l'origine d'une lymphocytose sont les maladies inflammatoires et les infections parasitaires ou virales. Par exemple, le nombre total de leucocytes et de lymphocytes était significativement plus élevé chez des serpents infectés par le protozoaire *Hepatozoon* que chez des individus sains (Campbell, 2014).

La cicatrisation de plaie est également associée à une lymphocytose tout comme les leucémies lymphoïdes et d'autres néoplasies hématopoïétiques (Campbell, 2015b).

Là encore, il est indispensable d'associer hémogramme, évaluation de la morphologie cellulaire et présentation clinique du patient pour trouver l'étiologie d'une lymphocytose. La présence de lymphocytes réactifs ([Figure 89](#)) au sein du frottis sanguin suggère une stimulation du système immunitaire. Pour rappel, ces cellules possèdent un cytoplasme plus abondant et basophile que les lymphocytes normaux, et une chromatine nucléaire moins condensée. L'observation d'une leucocytose marquée et d'un grand nombre de lymphocytes immatures et anormaux est plutôt en faveur d'une leucémie lymphoïde (Campbell, 2015b).

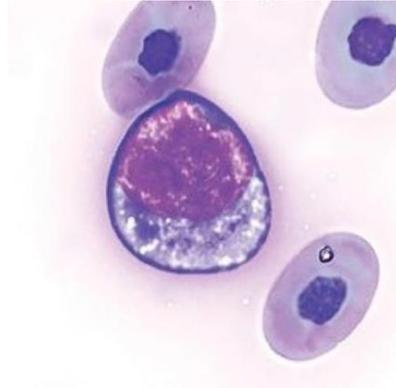


Figure 89 : lymphocyte réactif au sein d'un frottis sanguin de tortue sillonnée (*Centrochelys sulcata*) – coloration de Wright-Giemsa (Jacobson and Garner, 2020)

b) Lymphopénie

La lymphopénie est souvent secondaire au stress chronique, à une malnutrition chronique, ou encore à une maladie causant une immunosuppression (Campbell, 2015b).

L'administration de testostérone exogène, l'exposition aux corticostéroïdes endogènes ou exogènes et les infections bactériennes aiguës font également parti du diagnostic différentiel de la lymphopénie (Divers and Stahl, 2019).

Tableau XXXII : récapitulatif des principales causes de lymphocytose et de lymphopénie chez les reptiles (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013) (Campbell, 2014) (Campbell, 2015b) (Divers and Stahl, 2019)

Causes de lymphocytose	Physiologique	Variations saisonnières (été) Sexe : % lymphocytes femelle > % lymphocytes mâle Âge : % lymphocytes juvénile > % lymphocytes adulte Mue
	Pathologique	Maladie inflammatoire +/- infectieuse (virale, parasitaire) Cicatrisation de plaie Leucémie
Causes de lymphopénie	Physiologique	Variations saisonnières (hiver et hibernation)
	Pathologique	Anorexie ou malnutrition Immunosuppression Stress chronique Infection bactérienne aiguë Exposition aux corticostéroïdes (exogènes ou endogènes)

5. Monocyte

La pré-hibernation et l'hibernation peuvent causer une monocytose physiologique chez certaines espèces de reptiles comme la tortue gaufree (*Gopherus polyphemus*). Cependant, la proportion de monocyte est beaucoup moins influencée par la saison que les autres populations leucocytaires et cette influence n'existe pas chez toutes les espèces (Divers and Stahl, 2019).

Une monocytose peut survenir en raison d'une inflammation chronique ou d'une infection notamment bactérienne ou parasitaire. Dans certains cas, l'inflammation induite est de type granulomateuse et entraîne la formation de granulomes (Campbell, 2014).

Les autres étiologies comprennent la dystocie ou la leucémie, bien que rare chez les reptiles (Divers and Stahl, 2019). Certains chercheurs ont également observé une monocytose lors d'insuffisance rénale chez les chéloniens (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004).

Des monocytoses ont également été notées chez des lézards parasités par des hémoparasites du genre *Karyolysus* et des serpents parasités par le genre *Hepatozoon*. La cause de cette monocytose n'a pas été déterminée mais elle pourrait être liée à une réponse inflammatoire aux parasites sanguins (Campbell, 2015b).

Les principales causes de monocytose sont récapitulées ci-dessous (Tableau XXXIII). La monocytopenie n'a, quant à elle, pas été décrite chez les reptiles.

Tableau XXXIII : récapitulatif des principales causes de monocytose chez les reptiles (McArthur, Wilkinson and Meyer, 2004) (Divers and Stahl, 2019)

Causes de monocytose	Physiologique	Variations saisonnières (pré-hibernation et hibernation) : influence faible
	Pathologique	Infection chronique (aigüe plus rare) Inflammation chronique +/- granulomateuse Insuffisance rénale chronique Dystocie

C. Thrombocyte

On rappelle qu'il est primordial de s'assurer que la thrombocytopenie objectivée est réelle et non due à des amas de thrombocytes. Les causes de thrombocytopenie vraie sont nombreuses (Tableau XXXIV).

La thrombocytopenie survient lors d'utilisation périphérique excessive comme une hémorragie ou lors de diminution de la production dans des conditions pathologiques telles qu'une septicémie sévère, une coagulation intravasculaire disséminée ou une atteinte de la moelle osseuse (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013) (Jacobson and Garner, 2020). Les pathologies à médiation immunitaire peuvent également être mises en cause.

Les cellules souches pluripotentes à l'origine des thrombocytes peuvent également être recrutées dans d'autres lignées cellulaires, par exemple lors d'anémie sévère, ce qui entraîne une thrombocytopenie. Cette dernière peut également avoir lieu lors de malnutrition ou de maladie chronique causant une dépression des lignées cellulaires (Chitty and Raftery, 2013).

L'observation des thrombocytes au frottis peut être utile pour rechercher l'étiologie d'une thrombocytopenie car la présence de thrombocytes immatures dans le frottis sanguin indique une réponse régénérative (Campbell, 2015b). De même, les thrombocytes à noyaux polymorphes sont considérés comme anormaux et peuvent être associés à une maladie inflammatoire sévère ou à une anorexie prolongée (Campbell, 2014). Des thrombocytes binucléés peuvent également être observés chez des patients anémiques (Jacobson, 2007).

La thrombocytose n'a pas été décrite chez les reptiles.

Tableau XXXIV : récapitulatif des principales causes de thrombocytopenie chez les reptiles (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013) (Chitty and Raftery, 2013) (Jacobson and Garner, 2020)

Causes de thrombocytopenie	Physiologique	Non décrit
	Pathologique	Hémorragie Septicémie ou CIVD Maladie chronique ou dépression des autres lignées cellulaires (ex : anémie sévère) Pathologie de la moelle osseuse Maladie à médiation immune

PARTIE 4 : ETUDE PRELIMINAIRE DE L'INTÉRÊT DE L'AUTOMATE SYSMEX XT-2000I DANS L'ÉLABORATION D'UNE NUMÉRATION FORMULE SANGUINE CHEZ LA TORTUE GRECQUE

L'étude préliminaire présentée ci-après a pour but d'évaluer l'intérêt de l'automate Sysmex XT-2000i dans l'élaboration d'un hémogramme chez la tortue grecque. Pour cela, la performance du Sysmex a été comparée aux méthodes de référence. Pour déterminer la concentration en érythrocytes, en leucocytes, et en thrombocytes, la méthode de référence utilisée est la méthode de Natt et Herrick. Pour la détermination de l'hématocrite, il s'agit de la technique de microhématocrite. Le différentiel leucocytaire a été réalisé par observation microscopique du frottis sanguin. Une estimation manuelle de la concentration en leucocytes à partir de frottis sanguins a également été mise en œuvre dans le but d'être comparée à la méthode standard. Le TTC a été établi par estimation au frottis. Dans un deuxième temps, les résultats obtenus au cours de ce travail ont été comparés aux normes bibliographiques établies chez la tortue grecque.

I. Matériels et méthodes

A. Animaux

Afin de réaliser un échantillonnage, des critères d'inclusion ont été établis et sont résumés ci-après (*Tableau XXXV*). Seuls des individus maintenus en captivité et appartenant à l'espèce *Testudo graeca* ont été inclus dans cette étude. Les tortues ont ainsi été identifiées grâce aux critères de reconnaissance définis dans la partie 1 B5. Les sous espèces de tortues n'ont pas été identifiées.

Afin de garantir l'obtention d'un volume sanguin suffisant, soit 0,5 mL, et de respecter les recommandations en termes de volume prélevé, les individus de masse inférieure à 100 grammes ont été exclus. Cette étude visant principalement à comparer deux méthodes d'analyses, l'âge et le sexe des individus n'ont pas été considérés comme des critères de sélection. Le sexe a néanmoins été identifié grâce aux critères de reconnaissance définis dans la partie 1 B.4. Les individus ont été prélevés au cours du mois d'octobre, soit en période de pré-hibernation.

Un examen clinique rigoureux a été réalisé selon la méthode décrite au sein de la partie 1 IV et les individus inclus dans l'étude ne présentaient pas de signes pathologiques. Les conditions de maintenance des tortues prélevées ont été considérées comme adéquates : un individu vivait à l'intérieur au moment du prélèvement tandis que les autres évoluaient en enclos extérieur. De même, l'alimentation proposée était équilibrée et adaptée aux besoins de l'espèce.

Tableau XXXV : critères d'inclusion des individus de l'étude

Caractéristiques biologiques	Espèce	Tortue grecque au sens large : <i>Testudo graeca</i>
	Sexe	Indifférent
	Âge	Indifférent
	Poids	Supérieur à 100 grammes
Maintenance et état de santé	Environnement	Captivité (milieu extérieur ou intérieur)
	Maintenance	Conditions environnementales et alimentation adéquates
	État de santé	Anamnèse et examen clinique sans anomalie

Ainsi, cinq individus ont été prélevés et inclus dans l'étude. Leurs caractéristiques sont résumées ci-dessous (*Tableau XXXVI*).

Tableau XXXVI: caractéristiques des individus inclus dans l'étude

Individu	Sexe	Âge (années)	Poids (kg)	Environnement
Individu 1	M	9	1,083	Terrarium intérieur
Individu 2	F	Minimum 30	1,350	Enclos extérieur
Individu 3	F	Environ 40	1,353	Enclos extérieur
Individu 4	F	8	1,093	Enclos extérieur
Individu 5	F	60	2,949	Enclos extérieur

B. Prélèvements sanguins

La collecte des échantillons sanguins a été réalisée directement au domicile des propriétaires. Afin de prendre en considération les recommandations, bien que controversées, quant au risque de lymphodilution (partie 2 II.B.3.e), les prélèvements sanguins ont été réalisés à la veine jugulaire. Pour cela, deux opérateurs ont été requis. La méthode de contention mise en œuvre est détaillée dans la partie 2 II.B.3.d)(1) et le recours à la sédation ou à l'anesthésie des tortues n'a pas été nécessaire. La peau de la région cervicale jugulaire a été désinfectée avec des compresses imbibées d'alcool à 90° puis le prélèvement a été réalisé à l'aide d'une aiguille de 25G (0,5mm) montée sur une seringue de 1 mL non préalablement héparinée. Le volume collecté variait entre 0,5 et 1 mL selon les individus et la facilité de la ponction sanguine.

L'apparition de liquide transparent ou séro-hémorragique dans la seringue, synonyme de lymphodilution, a été soigneusement inspectée. Dans le cas où une lymphodilution était suspectée, le prélèvement a été écarté et une nouvelle ponction sanguine a été réalisée avec du matériel neuf. De même, l'observation d'un processus de coagulation au sein de la seringue de prélèvement a entraîné l'élimination de l'échantillon.

A l'issue de ce prélèvement, l'aiguille a été retirée puis trois frottis sanguins ont été réalisés grâce à la méthode de « bevel-edge slide » (partie 2 II.C.5.b) directement à partir du sang sans anticoagulant. Les lames de frottis ont été séchées et le prélèvement sanguin a été déposé dans un tube pédiatrique contenant de l'héparinate de lithium. L'échantillon, homogénéisé par inversion, a permis de réaliser trois nouveaux frottis sanguins selon une technique similaire et sur lames dûment identifiées.

C. Transport et délai d'analyses

Les prélèvements héparinés identifiés ont été placés dans un sac isotherme contenant un bloc de glace jusqu'à ce qu'ils soient acheminés au laboratoire. Les lames de frottis sanguins ont été stockées dans un porte lames après séchage. Le délai entre le prélèvement sanguin et la suite des analyses variait de 2 heures 30 min à 4 heures 30 min.

D. Analyses et objectifs

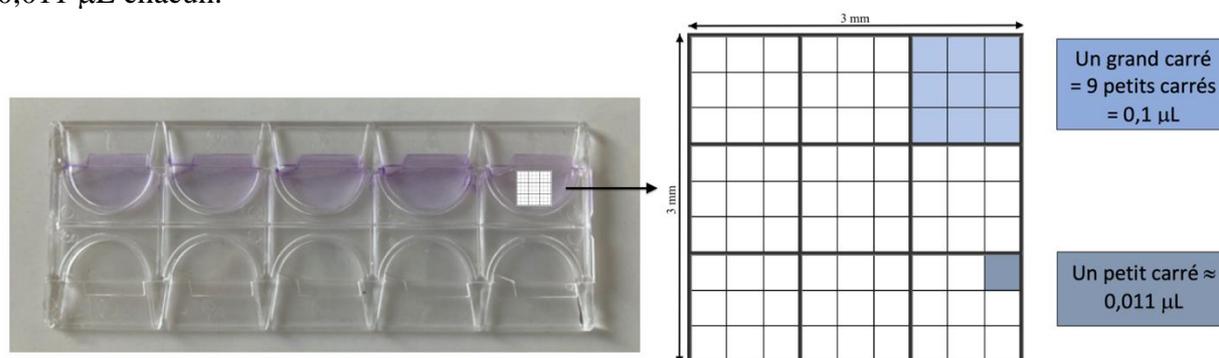
L'objectif de ce travail était de comparer la concentration en érythrocytes et la concentration en leucocytes obtenues par la méthode de référence, méthode de Natt et Herrick, avec celles obtenues par l'automate Sysmex après modification des secteurs de rencontre des nuages de points « scattergrams » chez la tortue grecque. Les résultats de ces deux méthodes ont été corrélés à ceux générés après observation des frottis sur lames colorées, méthode moins ambiguë pour la qualification des types cellulaires et leur proportion. Enfin, une tentative d'approche automatique du différentiel leucocytaire est proposée.

1. Méthode de Natt et Herrick

Comme expliqué au sein de la partie 2 II.C.4, la coloration de Natt et Herrick permet, grâce à un hémocytomètre, de compter les différentes populations cellulaires sanguines à savoir les érythrocytes, les leucocytes et les plaquettes. Cette méthode étant considérée comme la méthode de référence, les autres résultats ont été comparés à ceux générés par le comptage en coloration de Natt et Herrick.

La solution de Natt et Herrick a été préparée extemporanément en accord avec la méthode publiée (Thrall *et al.*, 2012). Cette technique de coloration sur cellules vivantes entraîne une dilution initiale de l'échantillon d'un facteur de 200. Le tube est ensuite laissé au repos pendant cinq minutes.

La grille de comptage utilisée est une lame Kova. Il s'agit d'une lame comportant 10 puits de comptage. La composition d'un puits est schématisée ci-dessous (Figure 90). Chaque puits contient 0,9 μ L de mélange et est constitué d'une grille carrée comportant 9 grands carrés de 0,1 μ L chacun. Chacun des 9 grands carrés est lui-même divisé en 9 petits carrés d'environ 0,011 μ L chacun.



Le dénombrement des trois types cellulaires a été obtenu par comptage manuel des cellules après leur identification à l'objectif x40 sur la lame quadrillée. Les érythrocytes étant bien plus nombreux que les plaquettes et les leucocytes, la méthode de comptage diffère de celle employée pour ces deux autres types cellulaires. Ainsi, les érythrocytes ont été dénombrés sur trois petits carrés de la diagonale du grand carré central tandis que les plaquettes et les leucocytes ont été comptés sur les neuf grands carrés du puits (Figure 91).

Comme expliqué au sein de la partie 2 II.C.4, les cellules touchant la ligne inférieure et la ligne gauche du carré ont été comptabilisées tandis que celles touchant les lignes supérieure et droite ne l'ont pas été.

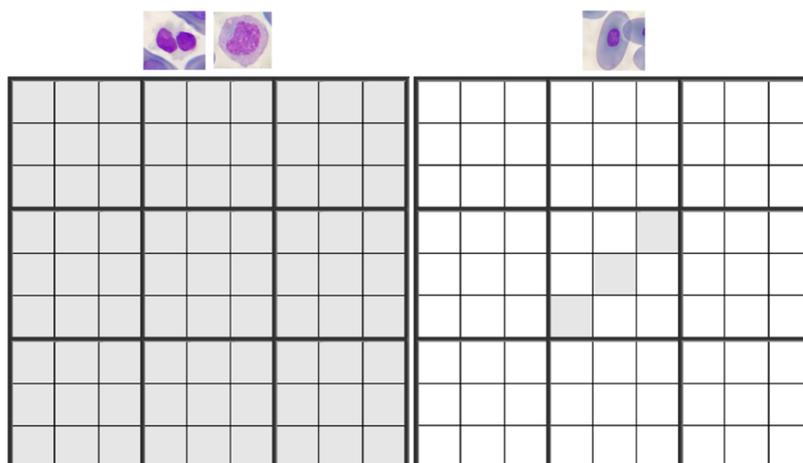


Figure 91 : zone de comptage des leucocytes et des thrombocytes à gauche, zone de comptage des érythrocytes à droite (photographies et schéma personnels)

Une fois les différents types cellulaires comptabilisés, les nombres totaux d'érythrocytes, de leucocytes et de thrombocytes par microlitre ont été obtenus grâce aux formules suivantes :

$$\text{RBC } (/ \mu\text{L}) = \text{nb moyen d'érythrocytes dans 1 petit carré} \times 81 \times 1,11 \times 200$$

$$\text{WBC } (/ \mu\text{L}) = \text{nb de leucocytes dans 9 grands carrés} \times 1,11 \times 200$$

$$\text{TTC } (/ \mu\text{L}) = \text{nb de thrombocytes dans 9 grands carrés} \times 1,11 \times 200$$

2. Méthode d'estimation par frottis

Les lames de frottis sanguins ont été colorées par une coloration de May-Grünwald Giemsa selon le protocole standard (Thrall *et al.*, 2012) puis séchées à l'air libre. Des frottis sanguins ont été réalisés avec et sans anticoagulant.

La réalisation du frottis sanguin nous a permis :

- D'évaluer la morphologie cellulaire et la qualité du prélèvement
- D'estimer la concentration en leucocytes grâce à la méthode expliquée dans la partie 2 II.C.5.e)(3)
- D'établir un différentiel leucocytaire afin de le comparer à celui obtenu par l'automate
- D'estimer la concentration en thrombocytes afin de le comparer à celui obtenu par l'automate

Ainsi, afin d'estimer la concentration en leucocytes, ces cellules ont été comptabilisées au microscope sur 10 champs observés à l'objectif x50 puis le nombre moyen de leucocytes par champ a été multiplié en fonction du coefficient d'ouverture de l'objectif utilisé, soit 2500 dans notre cas.

Le différentiel leucocytaire a été obtenu classiquement selon la méthode présentée dans la partie 2 II.C.5.e)(2) : 100 leucocytes rencontrés consécutivement au sein de la zone monocouche ont été différenciés en hétérophile, éosinophile, basophile, lymphocyte ou monocyte.

Enfin, la concentration en thrombocytes a été estimée en comptabilisant le nombre de thrombocytes observés sur 10 champs à l'objectif x100 puis en multipliant le nombre moyen de thrombocytes par champ par 15.

3. Comptage automatisé par le Sysmex

a) *Fonctionnement de l'automate Sysmex XT-2000i*

L'automate Sysmex XT-2000i utilisant la méthode de cytométrie en flux a été utilisé pour cette étude préliminaire.

La cytométrie en flux permet d'obtenir les caractéristiques physiques des cellules sanguines grâce à un flux de cellule unique traversant une source lumineuse. Pour cela, un échantillon de sang est aspiré et quantifié puis il est dilué à une concentration précise. Les érythrocytes sont hémolysés et les membranes cellulaires des leucocytes sont perméabilisées ce qui permet la coloration du prélèvement grâce à un fluorochrome qui se lie aux acides nucléiques. L'échantillon est alors acheminé dans la chambre de flux : les cellules circulent dans un conduit très étroit afin qu'elles traversent une à une le faisceau laser à semi-conducteur (Interchim, Innova Biosciences and Chromocyte, no date)(Sysmex Corporation, 2015).

Lorsqu'une cellule traverse le faisceau lumineux, une diffusion de la lumière se produit dans diverses directions. La détection de la dispersion lumineuse permet d'obtenir des informations sur les propriétés physiques de cette cellule. Ainsi, les lumières diffusées frontalement et latéralement sont détectées par des photodiodes : la dispersion lumineuse frontale fournit des informations sur la taille de la cellule, et la dispersion lumineuse latérale sur le contenu de la cellule et donc sur la granularité.

L'activité fluorescente de la lumière latérale est également détectée par un tube photomultiplicateur et permet d'obtenir des informations sur le contenu nucléaire de la cellule.

Enfin, cette lumière est convertie en signaux électriques ce qui permet l'acquisition et l'analyse des données. Au final, deux procédures d'analyses impliquant des réactions chimiques différentes permettent d'obtenir le nombre total de leucocytes par microlitre et de différencier les populations de leucocytes. Le pouvoir tinctorial des granules permet de différencier les granulocytes.

Deux types de graphiques de corrélation appelés « scattergrams » sont ensuite établis grâce à l'analyse de la diffusion lumineuse et de la lumière fluorescente (Sysmex Corporation, 2015).

- Le graphique de corrélation 4DIFF représente l'intensité de la lumière fluorescente latérale en fonction de l'intensité de la lumière diffusée latéralement.
- Le graphique de corrélation GB/BASO représente l'intensité de la lumière diffusée frontalement en fonction de l'intensité de la lumière diffusée latéralement.

Les deux types de graphiques présentés ci-dessous (*Figure 92*) ont été obtenus après analyse de sang humain au Sysmex.

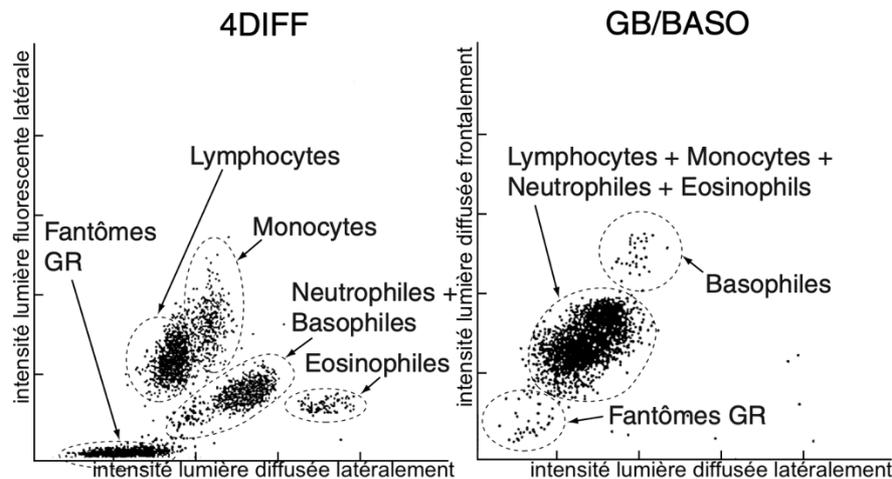


Figure 92 : graphiques 4DIFF et GB/BASO générés par l'automate Sysmex à partir de sang humain, adapté depuis (Sysmex Corporation, 2015)

Chez les mammifères, les cellules possédant des propriétés physiques et chimiques semblables forment donc un agrégat distinct au sein du scattergramme. Grâce à des algorithmes avancés, les cellules sont séparées en différentes populations ce qui permet d'établir la numération formule sanguine avec précision. Chez les animaux, ces graphiques présentent des spécificités liées à l'espèce.

Le Sysmex utilise également la méthode par impédance associée à la focalisation hydrodynamique. Chez les mammifères, cette technique permet la numération des érythrocytes et des thrombocytes. Pour cela, les cellules passent à travers un micro-orifice de comptage composé de deux électrodes traversées par un courant électrique. Ainsi, lorsqu'une cellule traverse l'orifice de comptage, l'impulsion électrique générée est proportionnelle au volume de la cellule. La focalisation hydrodynamique associée est utilisée en amont et en aval de l'orifice de comptage et consiste en une injection d'un liquide permettant de centrer les cellules et d'éviter leur déformation (*Sysmex France, no date*).

En parallèle, la concentration en hémoglobine a été mesurée par spectrophotométrie après lyse cellulaire par du lauryl sulfate (SLS). Un principe actif complexant équivalent à la méthode de quantification de l'hémoglobine après sa conversion en cyanméthémoglobine, assure la quantification de l'hémoglobine (partie 2 II.C.3).

b) Objectif de l'étude et réalisation

L'automate Sysmex XT-2000i est capable, chez les mammifères, de réaliser une numération formule sanguine à partir de ses différents canaux. La technologie par impédance est, sur cette machine, la référence pour la quantification des thrombocytes et des érythrocytes même si ces types cellulaires sont également quantifiés par les canaux à mesure optique. Les leucocytes étant nucléés, ils sont quantifiés et identifiés (leucogramme à cinq types cellulaires) après lyse des globules rouges et coloration des acides nucléiques par un fluorophore. Obtenant ainsi une séparation incluant la taille (et/ou la granularité) d'un côté et la fluorescence de l'autre, différentes populations cellulaires se distinguent : les hématies, les hématies avec du matériel ribonucléique (réticulocytes principalement) et les thrombocytes d'une part, et les différents

leucocytes d'autre part, seul type cellulaire nucléé. Ces populations sont identifiées et quantifiées sur la base de réglage machine d'aire : les populations cellulaires attendues ont été préalablement identifiées chez les espèces de mammifères et sont utilisées comme référence. Ces plages attendues peuvent être modifiées pour s'adapter à une autre espèce ou à une situation pathologique particulière.

Chez les reptiles, la présence de noyaux au sein des thrombocytes et des érythrocytes complique l'analyse de cytométrie en flux. Ces deux types cellulaires sont comptabilisés, par l'automate, comme des leucocytes. En conséquence, les différentes populations cellulaires se retrouvent chevauchantes ou mal résolues au sein des différents nuages de points.

L'objectif du travail était d'évaluer, par la modification des aires de mesurage, la possibilité d'approcher un comptage cellulaire fiable des différentes lignées. L'identification manuelle des populations au sein du scattergramme s'est ainsi basée sur la taille présumée des cellules et la granulosité de leurs noyaux. Ces réglages manuels ont été réalisés à cinq reprises afin d'obtenir le modèle le plus fiable possible. La *Figure 93* est donnée à titre d'illustration. Le modèle retenu pour l'analyse comparative est présenté ci-après (*Figure 94*)

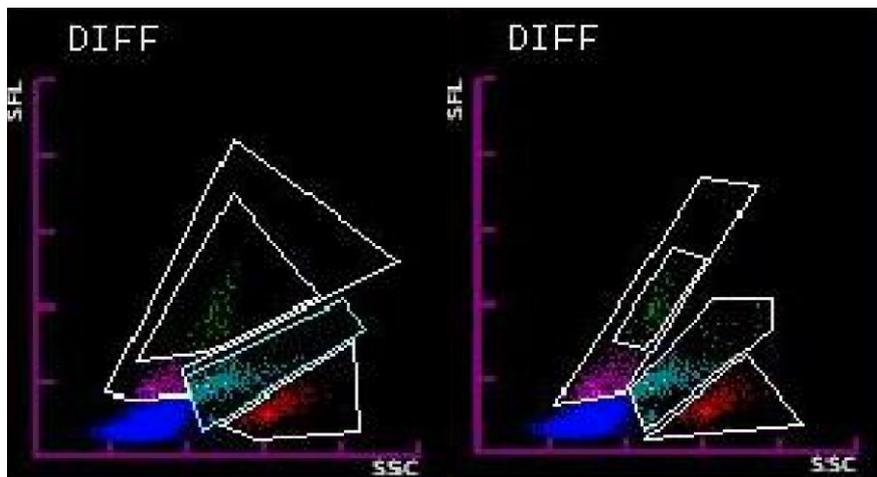


Figure 93 : essai de modèle à gauche et modèle sélectionné pour l'étude à droite chez la même tortue

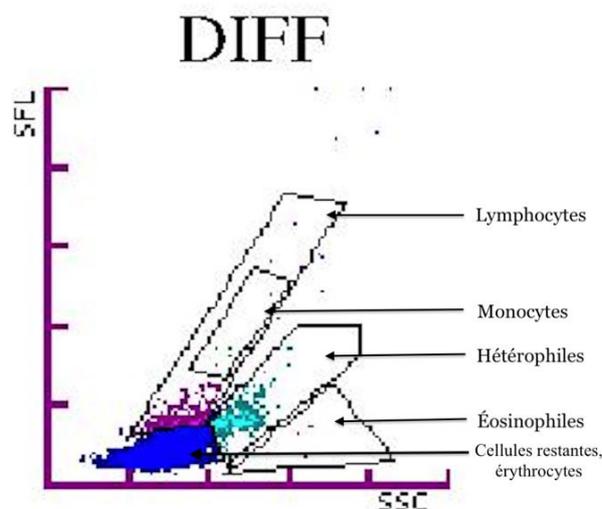


Figure 94 : modèle sélectionné pour l'étude et identification des populations cellulaires au sein du scattergramme

En plus de la mesure optique, le Sysmex dispose d'un canal de mesure en impédance. Cette technologie permet d'identifier les types cellulaires en fonction de leur taille. La capacité de la cellule de Coulter à séparer les types cellulaires chez la tortue grecque a également été évaluée.

En parallèle, l'automate a également mesuré la concentration en hémoglobine. Les valeurs obtenues au cours de ce travail ont été comparées à celles obtenues dans la littérature chez la tortue grecque au sein de la partie 4 III.E

4. Mesure du PCV par microhématocrite

Par ailleurs, une mesure du PCV par microhématocrite a été réalisée afin de comparer les résultats obtenus aux valeurs de référence bibliographiques au sein de la partie 4 III.E.

II. Résultats

A. Comparaison entre le comptage érythrocytaire (RBC) obtenu par la méthode de Natt et Herrick et par l'automate Sysmex

La méthode d'impédance est la méthode de référence pour quantifier la population érythrocytaire chez les mammifères. Dans notre étude, la grande taille des érythrocytes des reptiles excède les réglages usine de la cellule d'impédance qui plafonne à 150 fL. Le volume des érythrocytes de la tortue excède cette valeur plafond si bien que la cellule de Coulter n'identifie pas ni ne compte ce type cellulaire. Après contact auprès de la société Sysmex, il apparaît que cette contrainte est imposée par le réglage usine et que son paramétrage n'est pas accessible à l'utilisateur. Ainsi, la méthode de mesure en impédance ne permet pas d'accéder au comptage érythrocytaire des tortues du fait de la grande taille cellulaire.

Ainsi, seul le comptage en optique a été utilisé pour la comparaison avec la méthode manuelle de comptage. La concentration en érythrocytes (RBC), obtenue par la méthode de Natt et Herrick et par l'automate Sysmex est représentée ci-après (*Figure 95*). L'analyse statistique entre les deux méthodes a montré une tendance à la majoration du comptage par l'automate en comparaison avec la méthode de référence et ne montrait pas d'appariement significatif ($P=0.342$). L'interdépendance entre ces deux variables ne montrait pas de corrélation linéaire entre elles ($P = 0.3779$).

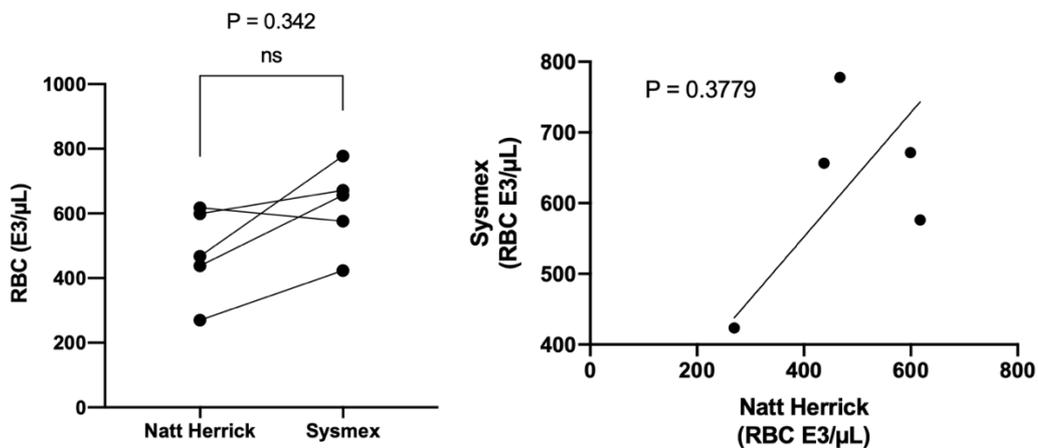


Figure 95 : comparaison du RBC obtenu par l'automate et la méthode de référence. Test de comparaison de Wilcoxon sur échantillons appariés à gauche et représentation de Deming de la corrélation entre les deux variables à droite

Ainsi, le nombre total d'érythrocytes par microlitre obtenu par les deux méthodes n'est pas apparié et les deux méthodes ne sont pas corrélées pour l'établissement du RBC.

B. Comparaison entre le comptage leucocytaire (WBC) obtenu par la méthode de Natt et Herrick et par l'automate Sysmex

Le WBC a été obtenu par la méthode de Natt et Herrick, par l'automate Sysmex et par une estimation sur frottis après coloration. La concentration en leucocytes, estimée par le compteur en mode fluorescence, n'apparaît pas corrélée au comptage manuel des leucocytes par la méthode de Natt et Herrick ($P=0.7257$) et les deux variables ne sont pas appariées ($P=0.342$) (Figure 96).

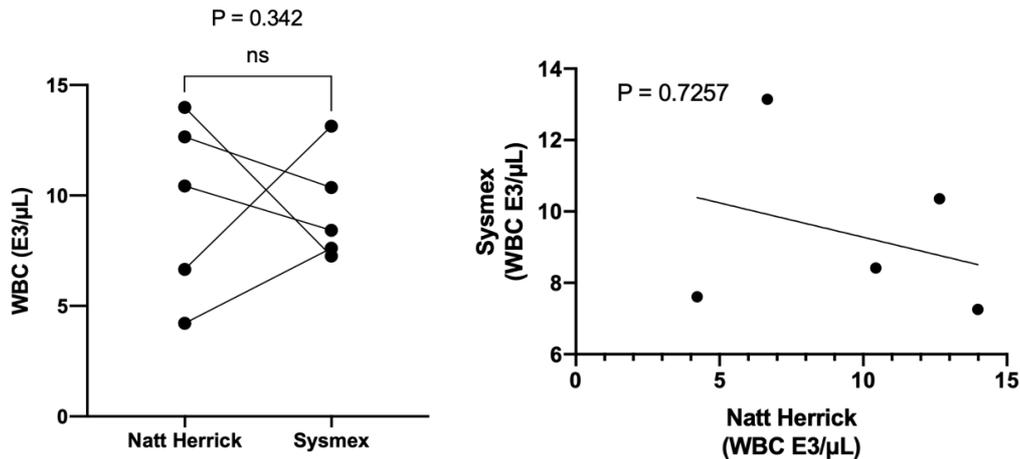


Figure 96 : comparaison du WBC obtenu par l'automate et la méthode de référence. Test de comparaison de Wilcoxon sur échantillons appariés à gauche et représentation de Deming de la corrélation entre les deux variables à droite

Ainsi, le nombre total de leucocytes par microlitre obtenu par les deux méthodes n'est pas apparié et les deux méthodes ne sont pas corrélées pour l'établissement du WBC.

De plus, l'analyse des graphiques générés par l'automate a montré que l'emplacement des populations leucocytaires au sein du scattergramme varie selon les individus (Figure 97). Cette variation individuelle des nuages de points limite la précision et donc l'usage clinique du Sysmex et sera débattue dans la discussion.

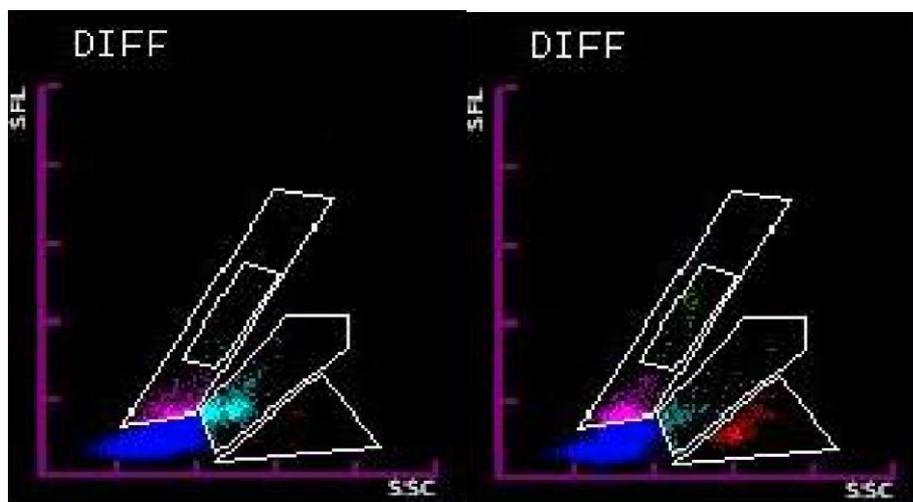


Figure 97 : variation de la répartition des nuages de points au sein du scattergramme selon les individus (tortue n°1 à droite et tortue n°2 à gauche)

C. Comparaison entre le comptage leucocytaire (WBC) obtenu par la méthode de Natt et Herrick et par frottis sanguin

Afin de s'assurer de la bonne identification des types cellulaires par l'opérateur dans la méthode de Natt et Herrick, une analyse comparative a été réalisée entre la méthode de référence et une estimation du comptage sur frottis coloré permettant, avec moins d'ambiguïté, d'identifier les différents types cellulaires. L'analyse comparative est représentée ci-après (*Figure 98*).

Les analyses statistiques de comparaison et de corrélation se sont également montrées non significatives ($P=0,067$ et $P=0,1636$). Toutefois, il faut convenir que la représentation de l'interdépendance a montré une certaine concordance entre les deux comptages. L'absence de significativité apparaît davantage être le fait d'un point fortement discordant sur un faible échantillonnage qu'une remise en cause de la méthode de référence. L'absence d'une forte corrélation entre ces deux méthodes manuelles invite néanmoins au questionnement et sera débattue dans la discussion.

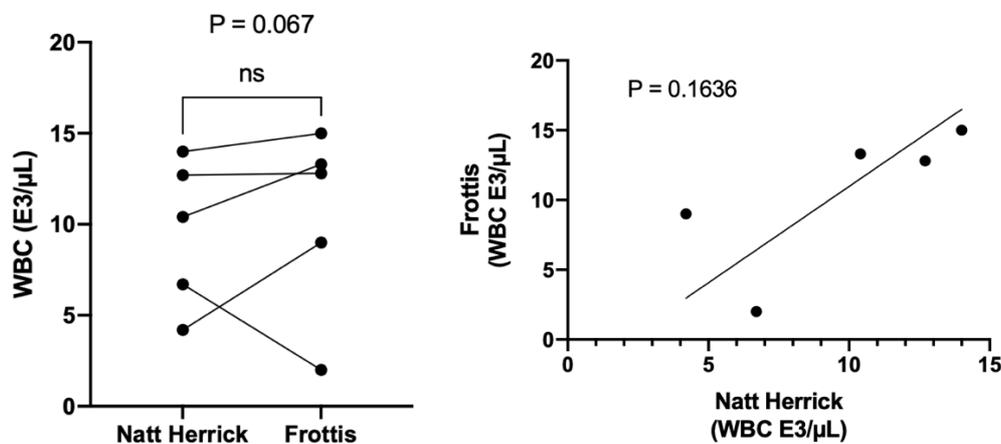


Figure 98 : comparaison du WBC obtenu par les méthodes de Natt-Herrick et par frottis. Test de comparaison de Wilcoxon sur échantillons appariés à gauche et représentation de Deming de la corrélation entre les deux variables à droite

Par ailleurs, l'observation au microscope des frottis sanguins réalisés avec et sans anticoagulant a montré que la qualité du frottis était meilleure sans anticoagulant. Ainsi, seuls les frottis réalisés sur sang frais ont été utilisés au sein de l'étude.

La ressemblance morphologique entre les thrombocytes et les lymphocytes, bien décrite dans la littérature, a également été objectivée lors de l'analyse des frottis sanguins (*Figure 99*).

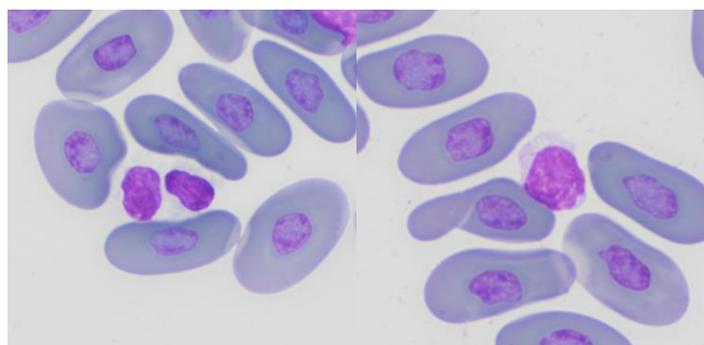


Figure 99 : plaquettes à gauche et lymphocyte à droite observés au frottis sanguin d'une tortue grecque – coloration de May-Grünwald Giemsa (photographie personnelle)

D. Comparaison du comptage plaquettaire (TTC) obtenu par frottis sanguin et par l'automate

Il n'a pas été possible d'identifier un nuage de points qui puisse être attribuable aux thrombocytes au sein du scattergramme. En effet, les thrombocytes et les lymphocytes ont des caractères cellulaires très semblables, il est donc probable que l'automate ne puisse pas les différencier en cytométrie en flux sur ce canal différentiel. Ainsi, il est possible que les thrombocytes soient contenus au sein du nuage de points attribué aux lymphocytes sur le scattergramme.

Sur le canal de l'impédance, une population de petite taille clairement identifiée apparaît ([Figure 100](#)).

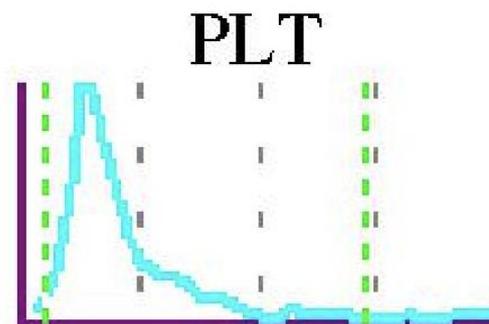


Figure 100 : exemple de graphique d'impédance généré pour les thrombocytes avec le modèle sélectionné

L'analyse comparative de cette population avec l'estimation du comptage plaquettaire sur frottis a montré une certaine correspondance ([Figure 101](#)). Lors de l'observation du frottis, un échantillon présentait des amas plaquettaires. Après exclusion de cet échantillon, la significativité de la corrélation a été retrouvée en dépit du très faible échantillonnage ($P=0.011$). L'analyse statistique d'appariement reste non significative ($P=0.167$).

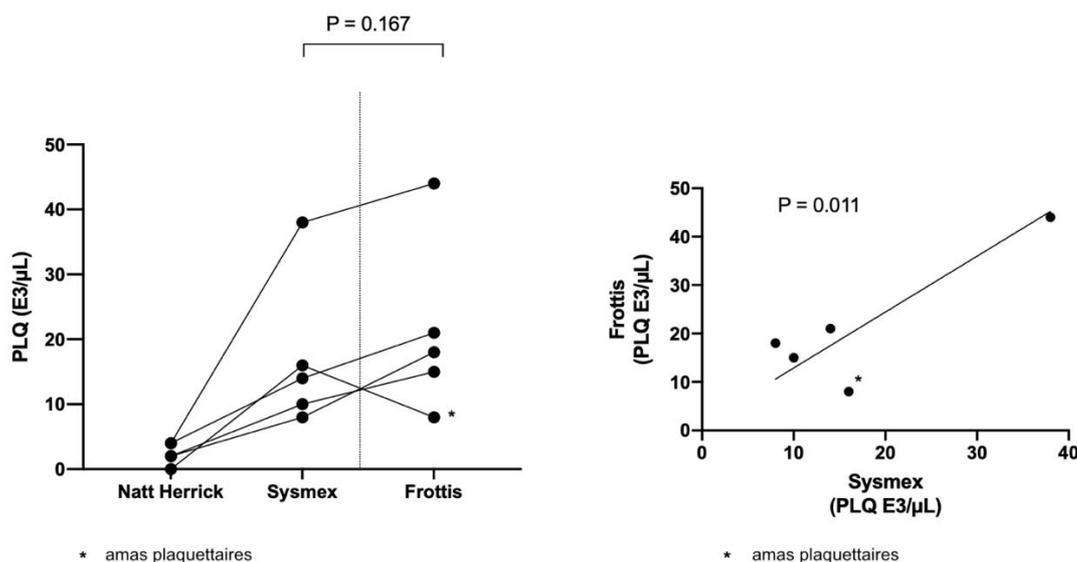


Figure 101 : comparaison du TTC obtenu par les méthodes de Natt-Herrick, par l'automate et par frottis. Test de comparaison de Wilcoxon sur échantillons appariés à gauche et représentation de Deming de la corrélation entre les deux variables à droite

Le comptage des thrombocytes par la méthode de référence de Natt-Herrick a montré des valeurs très différentes de celles obtenues par l'automate ou par les frottis sanguins (*Figure 101*). Cette différence de près d'un facteur 10 est très importante au sens biologique et à l'interprétation médicale que l'on peut en faire. Il convient de rappeler ici que la méthode dite de référence ne l'est que pour l'approche quantitative des érythrocytes et des leucocytes.

Pour l'établissement de la concentration en thrombocytes, la méthode d'estimation par frottis a donc été choisie comme méthode de référence à laquelle nous avons comparé la méthode d'impédance.

E. Comparaison du différentiel leucocytaire obtenu par frottis sanguin et par l'automate Sysmex

Le différentiel leucocytaire obtenu par frottis coloré constitue la méthode de référence et a été comparé au différentiel obtenu à partir de l'identification manuelle des populations cellulaires au sein du scattergramme (modèle 3). Afin de comparer ces méthodes, un test non paramétrique de Wilcoxon sur échantillons appariés a été réalisé. Deux autres modèles établis au Sysmex, à savoir les modèles 1 et 2, ont également été comparés à la méthode de référence (*Figure 102*).

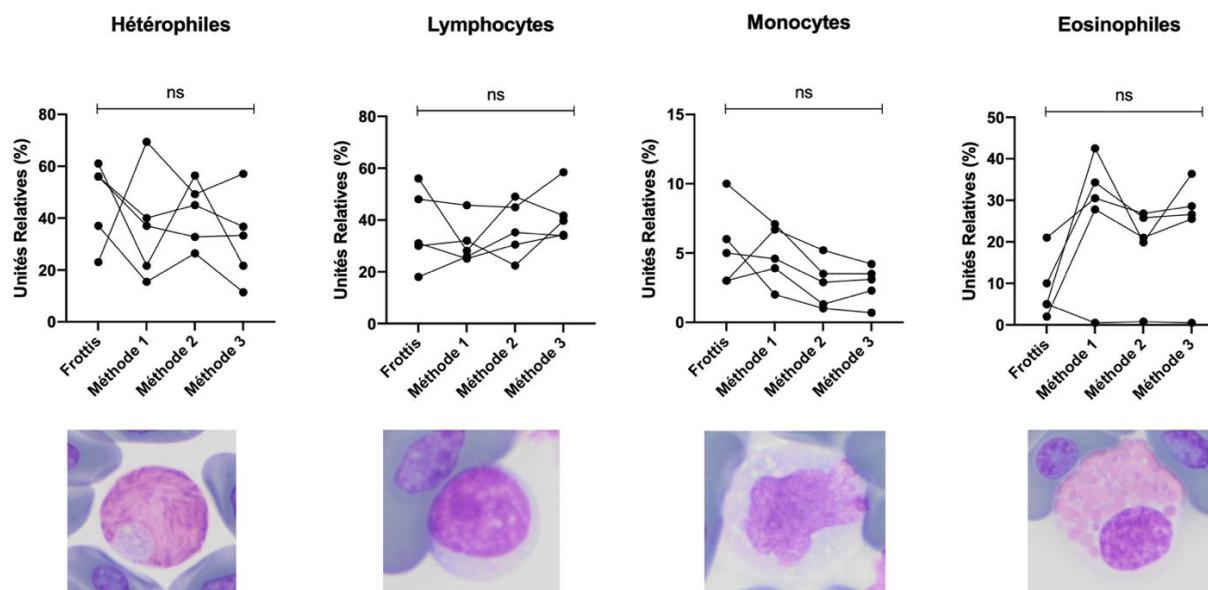


Figure 102 : comparaison du différentiel leucocytaire obtenu par frottis, par le modèle d'automate sélectionné (méthode 3) et par deux autres modèles (méthodes 1 et 2)

Aucune des trois méthodes testées sur le Sysmex n'est apparue significative pour identifier et pour quantifier les différents types de leucocytes. Aucune correspondance significative n'a pu être observée en dépit de morphologies cellulaires significativement différentes et une apparente résolution sur le scattergramme sur le canal de fluorescence. On remarque également que selon la méthode utilisée les populations relatives de leucocytes sont variables.

F. Établissement du PCV mesuré par microhématocrite et de la concentration en hémoglobine mesurée par l'automate Sysmex

Le PCV obtenu par microhématocrite et la concentration en hémoglobine obtenue par l'automate sont synthétisés ci-après (*Tableau XXXVII*).

Tableau XXXVII : mesure du PCV et de la concentration en hémoglobine

Paramètre et méthode de mesure	PCV (%)	Hb (g/dL)
	Par microhématocrite	Par Sysmex XT 2000i
Tortue 1	30	8,4
Tortue 2	21	5,5
Tortue 3	25	6,8
Tortue 4	26	6,9
Tortue 5	25	7,5

III. Discussion

L'objectif principal de cette étude étant de comparer les méthodes d'analyse mises en œuvre, les biais concernant la sélection des individus et la réalisation des prélèvements sanguins n'ont pas été étudiés.

A. Comparaison du RBC obtenu par la méthode de Natt et Herrick et par l'automate Sysmex

L'absence de corrélation et d'appariement du RBC mesuré par la méthode de Natt et Herrick d'une part et par cytométrie en flux d'autre part peut être expliquée par plusieurs éléments. Tout d'abord, l'automate Sysmex n'est pas conçu pour mesurer autant de cellules nucléées en cytométrie en flux. En effet, ce dernier est calibré pour quelques dizaines de milliers de leucocytes par microlitre. Chez les mammifères, le nombre d'érythrocytes est mesuré, sur le Sysmex, grâce au canal à impédance. Une difficulté technique supplémentaire rencontrée est la grande taille des érythrocytes chez la tortue. En effet, la cellule à impédance du Sysmex est uniquement destinée à évaluer les érythrocytes et est donc limitée à un volume cellulaire de 150 fL. Le volume des érythrocytes de tortues étant supérieur à 200 fL, ces cellules ne sont pas perçues comme un type cellulaire par l'automate. Seul le canal de fluorescence peut donc être utilisé pour le dénombrement de ce type cellulaire.

Au sein de notre modèle, les érythrocytes ont été dénombrés par cytométrie en flux en soustrayant le nombre de leucocytes au nombre total de cellules nucléées identifiées. De cette façon, une approche du comptage érythrocytaire a pu être obtenue même si une majoration significative du nombre est observée. L'absence de corrélation et d'appariement entre les deux méthodes, en dépit du faible échantillonnage, n'est pas en faveur d'une séparation cellulaire fiable. Dans un contexte clinique, cette surestimation n'apparaît pas satisfaisante car de nombreuses pathologies conduisent chez les chéloniens à des situations d'anémie (Saggese, 2009). Il convient donc d'effectuer les mesures de RBC à partir de sang de tortues anémiées afin d'évaluer si cette anomalie est détectable malgré une surestimation du RBC par l'automate.

Le canal à impédance ne pouvant être calibré pour de tels volumes cellulaires, seul le canal de fluorescence peut permettre le dénombrement des érythrocytes. Comme son apparente saturation participe à la mauvaise estimation du comptage cellulaire, il serait intéressant d'évaluer différents degrés de dilution sur le comptage cellulaire en rapprochant le nombre d'érythrocytes du nombre de leucocytes des mammifères.

Finalement, l'évaluation de la lignée rouge par la mesure du PCV par microhématocrite est plus fiable que la mesure du RBC par l'automate Sysmex.

B. Comparaison des méthodes pour l'établissement du WBC

1. Comparaison du WBC obtenu par la méthode de Natt et Herrick et par l'automate Sysmex

L'estimation de ce que pouvait être la population leucocytaire sur le canal WBC-Baso a montré un dénombrement cellulaire très éloigné du WBC établi par la méthode de Natt et Herrick. Ce canal est approprié pour quantifier le nombre de leucocytes chez les mammifères car les érythrocytes sont lysés et seules les cellules nucléées apparaissent. Par ailleurs, nous avons vu que ce canal apparaît complètement saturé par le nombre d'érythrocytes nucléés chez les chéloniens. Il est difficile de juger de l'impact de cette saturation sur le comptage précis de la population de leucocytes. Cette observation nous conduit à penser que la fraction érythrocytaire des chéloniens résiste à la lyse cellulaire. De nouveau, des essais de dilutions d'échantillons

sanguins devraient permettre d'éclairer sur une éventuelle faisabilité même s'il faut convenir que l'intérêt d'un dosage automatique est de faciliter la manipulation et que l'introduction de dilutions manuelles n'est pas pour alléger la tâche de l'opérateur. De même, différents tampons lytiques pourraient être testés pour évaluer leur action sur une lyse préférentielle des globules rouges. Cette dernière approche apparaît extrêmement fastidieuse et non facilitée par la relative rareté des échantillons biologiques.

L'estimation du nombre de leucocytes par microlitre a donc été évaluée en fluorescence sur le canal différentiel. Le dénombrement obtenu était du même ordre de grandeur que celui estimé en coloration de Natt et Herrick. Toutefois, ce nombre est apparu non corrélé à l'estimation manuelle. De plus, les résultats obtenus par l'automate consistent parfois en une surestimation du WBC mais une sous-estimation est également constatée dans certains cas. Il apparaît donc clairement que ces deux méthodes ne sont pas transposables et ces résultats portent un questionnement sur la nature précise des types cellulaires séparés sur ce canal. De plus, la présence d'une fraction importante d'érythrocytes contribue probablement à saturer également le canal et à rendre arbitraire la séparation avec les leucocytes.

Les variations entre le WBC établi par le Sysmex et par la coloration de Natt et Herrick peuvent tout de même être liées au chevauchement des populations cellulaires au sein du scattergramme. En effet, les thrombocytes possèdent un aspect et une taille similaires à ceux des lymphocytes d'où une confusion lors du comptage cellulaire à l'origine d'une surestimation du WBC. De plus, la zone graphique correspondant aux érythrocytes est adjacente à celle des lymphocytes et celle des hétérophiles (*Figure 94*). De ce fait, des érythrocytes peuvent avoir été comptés comme des leucocytes d'où une nouvelle surestimation du WBC par l'automate.

De plus, comme expliqué au sein de la partie 4 II.B une grande variation individuelle a été constatée lors de l'analyse des scattergrammes : selon les individus les agrégats cellulaires formés en fonction de la taille et de la structure interne des cellules sont disposés de façon variable au sein du graphique (*Figure 97*). Or le modèle sélectionné est unique et est utilisé pour tous les échantillons testés malgré les variations individuelles des nuages de points. Ainsi, l'inclusion, chez certains individus, d'un petit pourcentage d'érythrocytes au sein des nuages de points correspondant aux leucocytes induit une importante surestimation du WBC. Par exemple, si 1 % des érythrocytes est sélectionné au sein de la zone correspondant à un type leucocytaire, ce faible pourcentage correspondant à environ 6×10^3 cellules/ μL , ces nombreuses cellules sont comptées artéfactuellement au sein du WBC ce qui fausse la concentration réelle en leucocytes. Au contraire, chez certains individus, l'inclusion de leucocytes au sein de la zone graphique correspondant aux érythrocytes peut expliquer une sous-estimation du WBC.

Ainsi, la variation individuelle de la disposition des nuages de points et le fait que l'automate n'est pas conçu pour comptabiliser un tel nombre de cellules peuvent être considérés comme les principales sources d'erreur de mesure par l'automate. Il conviendrait donc d'établir les nuages de points individuellement au sein du scattergramme afin d'obtenir plus de précision mais l'intérêt clinique est moindre puisque cette méthode est chronophage.

2. Comparaison du WBC obtenu par la méthode de Natt et Herrick et par frottis sanguin

L'absence d'appariement d'échantillons et de corrélation entre les deux méthodes peut être expliquée par plusieurs éléments.

Tout d'abord, il convient de noter que l'estimation sur frottis a tendance à surestimer le nombre de leucocytes par rapport à la méthode de Natt et Herrick, hormis pour un échantillon (échantillon n°1). Cette surestimation pourrait être expliquée par la confusion visuelle des thrombocytes en lymphocytes car ils possèdent une morphologie semblable (*Figure 99*).

Une répartition non homogène des leucocytes au sein du frottis pourrait également expliquer cette surestimation. Cependant, l'examen de la zone monocouche des frottis sanguins n'a mis en évidence aucune anomalie. Il est tout de même important de souligner que la méthode d'évaluation au frottis constitue seulement une estimation du WBC. D'ailleurs, la formule utilisée pour l'estimation du WBC à partir du frottis sanguin pourrait également aggraver cette surestimation : comme expliqué au sein de la partie 2 II.C.5.e)(3), le coefficient multipliant le nombre moyen de leucocytes par champ varie selon les auteurs (Divers and Stahl, 2019). Le coefficient utilisé dans cette étude préliminaire est de 2500 pour un comptage réalisé à l'objectif x50 mais d'autres auteurs utilisent un coefficient multiplicateur inférieur. Le choix du coefficient multiplicateur a donc également une influence sur la détermination du WBC par frottis et donc sur l'appariement avec la méthode standard. Finalement, l'origine de cette surestimation reste mal connue.

La sous-estimation du WBC par analyse du frottis de l'échantillon n°1 pourrait être expliquée par une réalisation inadéquate du frottis sanguin : une mauvaise homogénéisation du prélèvement ou la formation d'un caillot sanguin au sein de la seringue juste avant réalisation du frottis sont les hypothèses les plus probables permettant de justifier une telle différence entre les deux méthodes. Cependant, une évaluation attentive de la queue de frottis a permis d'exclure une répartition hétérogène des cellules au sein du frottis. Des lymphocytes peuvent également avoir été considérés comme étant des thrombocytes au frottis mais cela ne justifierait qu'une faible différence de WBC entre les deux méthodes. Enfin, il est également possible que des thrombocytes aient été comptabilisés comme des lymphocytes en coloration de Natt et Herrick. Malheureusement, au vu du faible nombre d'individus prélevés, une erreur réalisée sur un seul échantillon suffit à causer une absence d'appariement statistique entre les deux méthodes. Pour évaluer la pertinence de ce modèle avec plus de fiabilité, il conviendrait donc d'inclure de nouveaux individus à l'étude.

C. Comparaison du TTC obtenu par frottis sanguin et par l'automate

La méthode de Natt et Herrick s'est montrée très insatisfaisante dans le comptage plaquettaire avec une sous-estimation extrêmement marquée par rapport à l'automate mais surtout par rapport au frottis sanguin. Cette méthode dite de référence pour l'établissement du RBC et du WBC chez les chéloniens est reconnue comme peu fiable pour le dénombrement thrombocytaire car la formation d'agrégats plaquettaires est fréquente au sein de l'hémocytomètre (partie 2 II.C.4.b)) (Nardini, Leopardi and Bielli, 2013).

Comme expliqué précédemment, la méthode de référence choisie pour l'établissement de la concentration en thrombocytes est donc la méthode d'estimation par frottis à laquelle nous avons comparé la méthode d'impédance.

Malgré l'absence d'appariement statistique, il apparaît tout de même que le TTC obtenu à partir des quatre échantillons ne présentant pas d'amas plaquettaires semble être cohérent avec celui obtenu par le Sysmex. De plus, la différence observée entre ces deux méthodes consiste toujours en une légère sous-estimation du TTC par l'automate. Le TTC est donc probablement légèrement surestimé lors du comptage par frottis. Cela pourrait être causé par la confusion entre lymphocytes et thrombocytes ou simplement par le fait que la formule d'établissement du TTC au frottis constitue seulement une estimation.

L'étude statistique réalisée met en évidence une corrélation entre l'automate et le frottis pour l'établissement du TTC. Il serait donc intéressant de recourir au Sysmex afin de dénombrer le nombre total de thrombocytes. Cette technique serait d'autant plus intéressante que la différenciation des lymphocytes et des thrombocytes au frottis requiert de l'expérience et des connaissances morphologiques précises. Toutefois, un point important reste à clarifier sur l'identité de cette population. En effet, le volume de cette population estimé par l'impédance est de l'ordre de 5 à 7 fL. Or ce petit volume n'est pas compatible avec la taille des thrombocytes observée au frottis. Néanmoins, le lien statistique nous invite à considérer que cette population soit effectivement des plaquettes. Il reste possible que le tampon de gaine de l'automate conduise à modifier significativement le thrombocyte en le limitant à la taille de son noyau.

Malgré tout, l'évaluation de la présence d'amas plaquettaires au frottis reste indispensable.

D. Comparaison du différentiel leucocytaire obtenu par frottis sanguin et par l'automate Sysmex

Dans l'idée de proposer un différentiel de la formule leucocytaire, plusieurs plages de mesure ont été définies manuellement à partir des nuages de points obtenus sur le canal différentiel. La définition des zones graphiques ainsi que la dénomination des champs reposent sur l'aspect morphologique des cellules au microscope mais elles restent relativement arbitraires. Quelle que soit la méthode utilisée, l'automate s'est montré très insatisfaisant pour proposer un différentiel compatible avec celui obtenu à partir du frottis sanguin. Les résultats peuvent différer substantiellement d'une méthode à l'autre mais aucune des méthodes testées n'est corrélée au différentiel réalisé au frottis. Si pour certaines estimations le faible écart entre les deux méthodes pourrait être jugé comme satisfaisant sur le plan médical, des éléments cellulaires importants comme les hétérophiles ou les éosinophiles apparaissent trop éloignés de la réalité pour pouvoir être exploités. De nouveau, l'absence de corrélation dans le différentiel provient très vraisemblablement de la persistance d'érythrocytes qui, par leur position, viennent interférer avec le comptage des lymphocytes et des hétérophiles. En effet, une faible part d'érythrocytes incluse au sein de la zone graphique d'une population leucocytaire, notamment au sein des lymphocytes ou des hétérophiles du fait de leurs positions présumées au sein du scattergramme (*Figure 94*), déséquilibre le nombre de cellules de cette population et donc toutes les proportions leucocytaires. En conséquence, un faible biais concernant un type leucocytaire a des répercussions sur toute la formule leucocytaire. La possibilité de pouvoir obtenir un différentiel réalisé par l'automate apparaît donc extrêmement délicate voire illusoire.

Bien qu'aucun appariement ne soit mis en évidence, il apparaît tout de même que le Sysmex est capable de séparer différentes populations cellulaires puisque des amas de points de couleur différentes sont visibles au sein du scattergramme. Il conviendrait donc d'utiliser le modèle établi avec un plus grand nombre d'échantillons : il est en effet possible que cela permette de s'affranchir des légères variations entre les méthodes qui rendent le modèle non utilisable statistiquement. Au contraire, en cas d'absence d'appariement malgré un grand

échantillonnage, la méthode de sélection manuelle des populations au sein du scattergramme devra être remise en cause.

E. Comparaison des résultats obtenus dans cette étude préliminaire avec les normes bibliographiques

Le deuxième objectif de cette étude est de comparer la numération formule sanguine obtenue par les différentes méthodes de prélèvement avec les normes physiologiques établies chez la tortue grecque.

Ces comparaisons sont réalisées à titre indicatif puisqu'aucune étude n'a été réalisée dans des conditions similaires à notre étude préliminaire. Pour commencer, bien que ce site soit considéré par de nombreux auteurs comme le gold standard, aucune étude n'a établi de normes hématologiques à partir de prélèvements sanguins à la veine jugulaire chez la tortue grecque. Or, comme expliqué dans la partie 2 I.C.1, la survenue de lymphodilution est variable selon le site de prélèvement chez les chéloniens. De la même manière, dans cette étude préliminaire les prélèvements sanguins ont été réalisés en période de pré-hibernation, ce qui n'est pas toujours le cas dans les études utilisées comme référence. Or, comme expliqué dans la partie 3 I.B.2.a), la saison a une influence sur les normes hématologiques. De plus, certaines normes ont été établies grâce à des méthodes d'analyse différentes de celles utilisées dans cette étude. Enfin, les cinq échantillons utilisés ne permettent pas l'établissement de normes physiologiques ce qui complique la comparaison avec les données disponibles. En conclusion, il conviendra donc d'interpréter ces analyses avec prudence et toujours en accord avec l'aspect clinique.

Comptage leucocytaire WBC et comptage érythrocytaire RBC

Seulement deux études menées chez la tortue grecque établissent le WBC et le RBC par la méthode de Natt et Herrick, et les résultats obtenus sont légèrement différents selon la source. En tenant compte de ces deux références, le WBC et le RBC obtenus dans notre étude sont relativement similaires aux normes bibliographiques ([Tableau XXXVIII](#) et [Tableau XXXIX](#)). En effet, comme rapportés ci-dessous, le WBC moyen obtenu par méthode de Natt et Herrick dans notre étude est de $9,59 \times 10^3/\mu\text{L}$ tandis que ceux obtenus dans la littérature par la même méthode sont de $9,3 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Lawrence and Hawkey, 1986) ou encore $3,99 \times 10^3/\mu\text{L}$ chez les individus mâles et $3,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ chez les femelles (Ali *et al.*, 2018). Le RBC moyen obtenu dans notre étude est de $478,3 \times 10^3/\mu\text{L}$ tandis que ceux obtenus dans la littérature par la même méthode sont de $810 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Lawrence and Hawkey, 1986) ou encore $780 \times 10^3/\mu\text{L}$ chez les individus mâles et $490 \times 10^3/\mu\text{L}$ chez les femelles (Ali *et al.*, 2018).

Le WBC obtenu par le Sysmex et celui obtenu par estimation au frottis sont également comparables aux normes bibliographiques bien qu'il soit peu précis de comparer des résultats obtenus par des méthodes d'analyses différentes.

Le RBC obtenu par le Sysmex est également similaire aux normes bibliographiques bien que là encore, elles aient été établies par une méthode d'analyse différente.

Tableau XXXVIII : comparaison du WBC moyen obtenu dans notre étude préliminaire et dans les références bibliographiques

Étude	Méthode utilisée	Précisions	Moyenne du WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	SD
Étude préliminaire	Natt Herrick	-	9,59	4,09
	Sysmex		9,40	2,0
	Frottis		10,40	5,18
Lawrence et al. - 1986	Natt Herrick modifié	Mois d'octobre	9,3	2,5
Ali et al. - 2018	Natt Herrick	Mâle	3,99	2,18
		Femelle	3,5	1,27

Tableau XXXIX : comparaison du RBC moyen obtenu dans notre étude préliminaire et dans les références bibliographiques

Étude	Méthode utilisée	Précisions	Moyenne du RBC ($10^3/\mu\text{L}$)	SD
Étude préliminaire	Natt Herrick		478,3	140,8
	Sysmex		621,2	132,0
Lawrence et al. - 1986	Natt Herrick modifié	Mois de janvier	810	130
Tosunoglu et al. - 2005	Coloration de Hayem		758,4	147
El-Mansoury et al. - 2014	Coloration de Hendrick	Mâle	817	245
		Femelle	668	126
Ali et al. - 2018	Natt Herrick	Mâle	780	200
		Femelle	490	140

Mesure du PCV

Comme le montre le [Tableau XL](#) ci-dessous, le PCV moyen obtenu par la méthode standard de microhématocrite est comparable aux normes établies dans les cinq études menées chez la tortue grecque par cette même méthode.

Tableau XL : comparaison du PCV moyen obtenu dans notre étude préliminaire et dans les références bibliographiques

Étude	Précisions	PCV (%)
Étude préliminaire	-	25,4
Lawrence et al. - 1986	Résultats du mois de janvier	33
Tosunoglu et al. - 2005	-	28,80
Mathes et al. - 2006	-	23
El-Mansoury et al. - 2014	Mâles	27,72
	Femelles	23,68
Ali et al. - 2018	Mâles	27,61
	Femelles	20,25

Mesure de la concentration en hémoglobine Hb

La concentration en hémoglobine mesurée dans cette étude par l'automate est également cohérente avec les normes établies au cours des quatre études de référence. En effet, la concentration en hémoglobine moyenne obtenue dans notre étude préliminaire est de 7,02g/dL tandis que celles présentes dans la littérature varient entre 7,22g/dL et 10,25g/dL (Lawrence and Hawkey, 1986) (Ali *et al.*, 2018) (Tosunoglu, 2005) (El-Mansoury, Hamooda and Mehdi, 2014).

Cependant, toutes ces études n'utilisent pas la même méthode de mesure. En particulier, comme expliqué dans la partie 2 II.C.3, il est recommandé de centrifuger l'échantillon avant lecture de l'absorbance. Or, le Sysmex ne réalise pas cette centrifugation : les noyaux libres des érythrocytes lysés ne sont pas éliminés ce qui peut engendrer une surestimation de la concentration en hémoglobine. Néanmoins, mise à part l'étude menée par Mansoury et al. qui précise ne pas avoir effectué cette centrifugation, aucune des quatre références bibliographiques établissant la concentration en hémoglobine chez la tortue grecque ne précise si cette centrifugation a été réalisée.

F. Limites et amélioration du modèle établi dans cette étude préliminaire

1. Mesures par impédance

Le Sysmex utilisé dans cette étude semble pertinent pour l'établissement du nombre total de thrombocytes par microlitre par la méthode d'impédance. Bien que le volume de la population cellulaire identifiée par ce canal soit inférieur à celui attendu, cette dernière correspond statistiquement à la population plaquettaire dénombrée au frottis sanguin. Malgré tout, la réalisation de frottis sanguins reste indispensable pour identifier la présence d'amas plaquettaires qui engendrent une sous-estimation du TTC mesuré par impédance.

En revanche, au vu de la grande taille des érythrocytes des reptiles, le RBC obtenu par cette méthode n'est pas exploitable car la cellule d'impédance utilisée plafonne à un volume inférieur à celui des érythrocytes des chéloniens. Il serait donc intéressant de configurer de nouveaux réglages machine ou de concevoir des cellules de Coulter capables de dénombrer des cellules de grands volumes.

2. Mesures par cytométrie en flux

Il est primordial de tester le modèle Sysmex établi en analysant de nombreux échantillons sanguins de tortues grecques. En effet, les cinq échantillons utilisés dans ce travail sont insuffisants et ne permettent pas de mener une étude statistique fiable quant à la comparaison des méthodes d'analyse. En effet, une erreur de mesure sur un seul échantillon fausse l'entièreté des analyses statistiques puisqu'un échantillon représente à lui seul 20 % de l'effectif total.

Afin d'évaluer l'intérêt clinique de ce modèle, il serait également intéressant d'analyser du sang de tortues présentant d'importantes anomalies de l'héмограмme mises en évidence par la méthode de Natt et Herrick. En effet, si l'analyse Sysmex met, elle aussi, en évidence ces anomalies, et ce malgré une absence d'appariement avec la méthode standard, nous pourrions conclure que malgré le manque de précision de cette méthode, le Sysmex semble être utile pour mettre en évidence d'importantes anomalies hématologiques. Par exemple, il serait pertinent d'analyser du sang de tortues grecques présentant une leucocytose marquée afin d'évaluer la capacité du Sysmex à démontrer cette anomalie. La leucopénie semble, quant à elle, plus difficile à mettre en évidence car une légère anomalie de comptage due à une confusion entre

érythrocytes et leucocytes peut conduire à une surestimation des leucocytes. Compte tenu de la faible concentration leucocytaire, cette confusion cellulaire, même minime, pourrait masquer la leucopénie. Malgré tout, il est important de garder à l'esprit que, comme expliqué dans la partie 3 II.B, l'inflammation causée par une pathologie chez certaines espèces de reptiles peut davantage provoquer une variation de la formule leucocytaire qu'une variation de la concentration en leucocytes (Divers and Stahl, 2019). L'établissement du différentiel leucocytaire n'est donc pas à négliger. À cet égard, la réalisation d'un frottis est à privilégier d'autant plus qu'il apporte des informations complémentaires d'ordre morphologique. Le modèle Sysmex actuel fournit un différentiel leucocytaire peu fiable. Cependant, l'automate est tout de même capable d'identifier différentes populations cellulaires au sein du scattergramme. Une augmentation de l'effectif permettrait donc d'évaluer l'implication du faible nombre d'échantillons dans le manque de fiabilité du modèle. Dans le cas où ce dernier serait peu fiable malgré un grand effectif, il conviendrait de réévaluer le modèle sélectionné.

D'autre part, la sélection du modèle le plus adéquat a été réalisée par comparaison relativement subjective du WBC, du RBC et du différentiel leucocytaire obtenus par le Sysmex avec ceux obtenus par la méthode standard. Des examens plus rigoureux impliquant des logiciels d'analyse permettraient la sélection d'un modèle le plus précis possible.

De plus, les automates actuels génèrent, en mesure optique, des graphiques en deux dimensions prenant en compte la taille de la cellule en fonction de sa granularité. Des automates séparant les cellules selon trois paramètres sont en cours d'élaboration. En effet, ceux-ci prendront également en compte la profondeur de champ, reflet du volume de la cellule, ce qui pourrait apporter des informations supplémentaires et permettre d'établir un modèle fiable chez les reptiles. Un tel modèle serait profitable aux praticiens qui bénéficieraient d'une méthode plus simple et rapide que la coloration standard de Natt-Herrick. De même, des critères de séparation des cellules plus fiables comme les valeurs de tension et d'amplitude des détecteurs de photodiodes pourraient également être déterminés et mis en application grâce à des logiciels logarithmiques (Carvalho *et al.*, 2016).

En conclusion, l'analyse d'un plus grand nombre de prélèvements et d'échantillons présentant des anomalies hématologiques avérées ainsi que la réalisation de dilutions sanguines semblent être primordiales afin de réévaluer la fiabilité et l'intérêt clinique de ce modèle. La cytométrie en flux est une technique permettant de mesurer les caractéristiques phénotypiques de cellules et de générer une numération formule sanguine grâce à l'analyse de scattergramme. Cependant, l'identification de sous-populations de leucocytes dans le sang périphérique des reptiles est difficile car les érythrocytes et les thrombocytes sont nucléés et de taille et de forme variables ce qui masque la différenciation des sous-populations de leucocytes. Il serait donc intéressant de séparer les leucocytes des érythrocytes pour pouvoir utiliser la technique de cytométrie en flux chez les reptiles (Muñoz *et al.*, 2014). Une telle isolation de leucocytes requiert l'utilisation de gradient de densité. Après ajout de l'agent de densité dans le sang dilué et centrifugation, la couche de leucocytes est récoltée puis lavée et remise en suspension. Ensuite, les leucocytes peuvent être analysés grâce à la méthode de cytométrie en flux associée à un logiciel d'acquisition. L'analyse de la diffusion de la lumière associée à des analyses impliquant des échelles logarithmiques et linéaires permet de déterminer les critères de séparation des cellules les plus fiables. Ainsi, l'étude de Carvalho *et al.* s'intéresse aux protocoles d'isolement leucocytaire grâce à des gradients de densité chez les serpents. Cette séparation cellulaire permet ensuite de caractériser les cellules isolées par cytométrie en flux en fonction de la taille et de la complexité interne et de déterminer un différentiel leucocytaire qui sera comparé à celui obtenu par frottis sanguin (Carvalho *et al.*, 2016). Là encore, cette méthode offre de bons

résultats mais il s'agit d'analyses chronophages et techniques présentant donc peu d'intérêt pour le praticien.

L'utilisation de marqueurs ou de colorants spécifiques à certains types cellulaires pourrait également permettre de perfectionner l'application de la cytométrie en flux dans l'élaboration d'une numération formule sanguine chez les reptiles. Chez les poulets, un anticorps monoclonal associé à des marqueurs spécifiques a permis d'établir une technique de cytométrie en flux simple et quantifiant les cellules sanguines (Seliger *et al.*, 2012). Les échantillons sanguins ont ainsi été incubés avec un mélange d'anticorps spécifiques aux leucocytes de poulet et conjugués à des fluorochromes. Le nombre total de leucocytes ainsi que les nombres de thrombocytes, de monocytes, d'hétérophiles et de lymphocytes T et B ont donc été déterminés par cytométrie en flux en une seule étape, sans séparation cellulaire et sans lavage cellulaire. Des études génomiques menées chez les reptiles sont nécessaires afin de recourir à cette méthode chez ces espèces. Elles pourront ensuite faciliter le développement d'outils automatisés et appropriés pour l'élaboration d'un hémogramme chez les reptiles.

CONCLUSION

Les analyses hématologiques sont très fréquemment mises en œuvre chez les mammifères de par leur facilité d'exécution et leur disponibilité. A contrario, elles sont rarement employées chez les reptiles et cela s'explique par des difficultés techniques et d'interprétation des résultats.

L'interprétation de l'hémogramme chez ces espèces est rendue délicate par de nombreux facteurs tels que les conditions environnementales, l'état physiologique, l'âge, ou encore le sexe, qui influent sur l'hémogramme normal des reptiles. Ces paramètres ne sont que rarement ou partiellement pris en compte au sein des études établissant des valeurs de référence hématologique chez ces espèces, ce qui complique leur interprétation. De plus, les études fournissant des intervalles de référence sont peu nombreuses et n'évaluent pas tous les mêmes sites de ponction veineuse et les mêmes méthodes d'analyses. Dans la mesure du possible, les résultats obtenus doivent être comparés aux normes établies dans les mêmes conditions. De nouvelles études sont donc nécessaires pour faciliter l'interprétation des hémogrammes chez les reptiles et notamment chez la tortue grecque.

Par ailleurs, en raison de leurs érythrocytes et de leurs thrombocytes nucléés, l'usage de compteurs cellulaires automatisés n'est pas recommandé chez les reptiles. Des méthodes manuelles de comptage sont donc nécessaires, et à ce titre, les colorations de Natt-Herrick et de phloxine B ainsi que la réalisation de frottis sanguins constituent les méthodes standards d'analyse pour l'établissement de la formule leucocytaire. Ces méthodes d'analyses manuelles sont techniques et chronophages pour le praticien et nécessitent du matériel. Ainsi, l'établissement d'une méthode automatisée serait profitable aux praticiens qui bénéficieraient d'un procédé plus simple et rapide que la coloration standard de Natt-Herrick.

Pour cela, l'automate Sysmex XT2000i a été comparé aux méthodes de référence de comptage pour l'établissement d'une numération formule sanguine chez la tortue grecque. Cette étude, qui utilise le principe de cytométrie en flux et d'impédance, met en évidence que la distribution des cellules au sein du scattergramme est variable selon les individus ce qui limite l'intérêt de l'automate notamment pour l'établissement du différentiel leucocytaire. Par ailleurs, la technique d'impédance n'est pas fiable pour l'établissement des valeurs de la lignée rouge car l'automate n'est pas calibré pour prendre en charge de tels volumes cellulaires. Cette étude préliminaire nécessite également d'être employée avec un plus grand nombre d'échantillon afin de s'affranchir des difficultés d'interprétation causées par le faible échantillonnage. Pour l'heure, les techniques manuelles restent donc indispensables pour l'établissement de l'hémogramme chez la tortue grecque. Toutefois, l'automate a permis d'identifier différents contingents cellulaires et si pour l'heure la technologie ne permet pas de séparer ces populations du bruit de fond causé par les érythrocytes et thrombocytes nucléés, on peut espérer que les prochaines générations d'automates en seront capables.

BIBLIOGRAPHIE

Abid, A.H. (2018) 'Hemoglobin measurement cyanmethemoglobin, HiCN, Drabkin's Method' [en ligne], pp. 1–12. Available at: https://www.researchgate.net/publication/323784140_HEMOGLOBIN_MEASUREMENT_Cyanmethemoglobin_HiCN_Drabkin's_Method (Accessed: 2 June 2020).

Ali, A.F. *et al.* (2018) 'Hematological and parasitological investigation in Testudo graeca (Linnaeus, 1758) tortoise kept in Egypt' [en ligne], *Kafrelsheikh Veterinary Medical Journal*, pp. 45–60. Available at: https://kvmj.journals.ekb.eg/article_110207.html (Accessed: 30 September 2020).

'American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) 39th Annual Meeting: In conjunction with the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) 55th Annual Meeting' [en ligne] (2004) *Veterinary Clinical Pathology*, 33(3), pp. 183–191. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1939-165X.2004.tb00373.x> (Accessed: 26 October 2020).

Andreani, G. *et al.* (2014) 'Reference values for hematology and plasma biochemistry variables, and protein electrophoresis of healthy Hermann's tortoises (Testudo hermanni ssp.)' [en ligne], *Veterinary Clinical Pathology*, 43(4), pp. 573–583. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/vcp.12203> (Accessed: 30 April 2020).

Andreu, A.C. *et al.* (2004) 'Testudo graeca' [en ligne], *Manouria*, 7(22), pp. 17–18. Available at: https://www.researchgate.net/publication/267098347_Testudo_graeca?enrichId=rgreq-f9abf660ad3245002cc888494d0885c8-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzI2NzA5ODM0NztBUzo2OTUzNzMyMjgxNzEyNjZAMTU0MjgwMTMwNTkwOQ==&el=1_x_2&_esc=publicationCoverPdf (Accessed: 29 October 2020).

Arikan, H. *et al.* (2015) 'Blood cells morphology of Testudo graeca and Testudo hermanni (Testudines: Testudinidae) from Turkey' [en ligne], 9, pp. 113–116. Available at: https://www.researchgate.net/publication/292463989_Blood_cells_morphology_of_Testudo_graeca_and_Testudo_hermannii_Testudines_Testudinidae_from_Turkey (Accessed: 29 September 2020).

Arnold, J. (1994) 'White blood cell discrepancies in atlantic loggerhead sea turtles: Natt-Herrick VS. Eosinophil Unopette', *Proceedings of the 14th Annual Conference of the Association of Zoo Veterinary Technicians*, pp. 15–22.

Benattar, L. and Flandrin, G. (1999) 'Comparison of the classical manual pushed wedge films, with an improved automated method for making blood smears' [en ligne], *Hematology and Cell Therapy*, 41(5), pp. 211–215. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00282-999-0211-7> (Accessed: 17 May 2020).

Bielli, M. *et al.* (2015) 'Hematological values for adult eastern Hermann's tortoise, Testudo hermanni boettgeri in semi-natural conditions' [en ligne], *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(1), pp. 68–73. Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1040638714561251> (Accessed: 30 April 2020).

Bonadiman, S.F. *et al.* (2010) ‘Hematological parameters of *Ameiva ameiva* (Reptilia: Teiidae) naturally infected with hemogregarine: Confirmation of monocytosis’ [en ligne], *Veterinary Parasitology*, 171(1), pp. 146–150. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440171000172X> (Accessed: 15 October 2020).

Bour, R. (2012) *Les tortues: terrestres et aquatiques*. Éd. revue et corrigée. Maurens: Animalia éd (Atlas de la terrariophilie, volume 2).

Bulté, G., Verly, C. and Blouin-Demers, G. (2006) ‘An improved blood sampling technique for hatchling Emydid Turtles’ [en ligne], *Herpetological Review*, pp. 318–319. Available at: https://www.researchgate.net/publication/255572193_An_Improved_Blood_Sampling_Technique_for_Hatchling_Emydid_Turtles (Accessed: 5 May 2020).

Campbell, T.W. (2014) ‘Chapter 8 - Clinical Pathology’, in Mader, D. R. and Divers, S. J., *Current Therapy in Reptile Medicine and Surgery*. St. Louis, Mo: Elsevier Saunders, pp. 70–92.

Campbell, T.W. (2015a) ‘Evaluation of the blood film’ [en ligne], *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 18(1), pp. 117–135. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1094919414000577> (Accessed: 1 May 2020).

Campbell, T.W. (2015b) *Exotic animal hematology and cytology*. Fourth edition. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.

Campbell, T.W. and Ellis, C. (2007) *Avian and exotic animal hematology and cytology*. 3rd ed. Ames, Iowa: Blackwell Pub.

Carisch, L. *et al.* (2019) ‘White blood cell count in birds: Evaluation of a commercially available method’ [en ligne], *BMC Veterinary Research*, 15(1), p. 93. Available at: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-019-1834-8#citeas> (Accessed: 21 October 2020).

Carvalho, M.P.N. *et al.* (2016) ‘Flow cytometric characterization of peripheral blood leukocyte populations of 3 neotropical snake species: *Boa constrictor*, *Bothrops jararaca*, and *Crotalus durissus*’ [en ligne], *Veterinary Clinical Pathology*, 45(2), pp. 271–280. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/vcp.12358> (Accessed: 14 December 2020).

Cerreta, A.J. *et al.* (2018) ‘Assessment of a visual scoring system for identifying and quantifying anemia in male Eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*)’ [en ligne], *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 49(4), pp. 977–982. Available at: <https://doi.org/10.1638/2018-0045.1> (Accessed: 8 October 2020).

Cheyilan, M. *et al.* (2004) *Testudo graeca*. *The IUCN Red List of Threatened Species*. Available at: <https://www.iucnredlist.org> (Accessed: 29 October 2020).

Chitty, J. and Raftery, A. (2013) *Essentials of tortoise medicine and surgery*. Chichester: Wiley.

Christopher S. Hanley *et al.* (2004) ‘Comparison of the effect of dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid and lithium heparin on hematologic values in the green iguana (*Iguana iguana*)’ [en ligne], *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 35(3), pp. 328–332. Available at: <https://bioone.org/journals/journal-of-zoo-and-wildlife-medicine/volume-35/issue-3/03-057/COMPARISON-OF-THE-EFFECT-OF-DIPOTASSIUM-ETHYLENEDIAMINETETRAACETIC-ACID-AND-LITHIUM/10.1638/03-057.short> (Accessed: 4 October 2020).

CITES (no date) *Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées* [en ligne]. Available at: <https://cites.org/fra/disc/text.php> (Accessed: 17 December 2020).

Claver, J.A. and Quaglia, A.I.E. (2009) ‘Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates’ [en ligne], *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18(2), pp. 87–97. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1557506309000445> (Accessed: 30 April 2020).

Deem, S. *et al.* (2007) ‘Blood values in free-ranging nesting leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*) on the coast of the Republic of Gabon’ [en ligne], *Journal of zoo and wildlife medicine : official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 37, pp. 464–71. Available at: <https://bioone.org/journals/journal-of-zoo-and-wildlife-medicine/volume-37/issue-4/05-102.1/BLOOD-VALUES-IN-FREE-RANGING-NESTING-LEATHERBACK-SEA-TURTLES-DERMOCHELYS/10.1638/05-102.1.short> (Accessed: 21 October 2020).

Deem, S.L. *et al.* (2009) ‘Comparison of blood values in foraging, nesting and stranded loggerhead turtles (*Caretta Caretta*) along the coast of Georgia, USA’ [en ligne], *Journal of Wildlife Diseases*, 45(1), pp. 41–56. Available at: <http://www.jwildlifedis.org/doi/10.7589/0090-3558-45.1.41> (Accessed: 29 September 2020).

Díaz-Paniagua, C. and Andreu, A.C. (2009) ‘Tortuga mora – Testudo graeca.’, in Salvador, A. and Marco, A. (eds) *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales. Madrid, pp. 1–40.

Dilrukshi, N., Jayasooriya, A. and Prathapasinghe, G. (2019) ‘Hematological parameters and morphological characteristics of blood cells in turtle and tortoise species within captivity in Sri Lanka’ [en ligne], *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 6(3), p. 266. Available at: <https://www.ejmanager.com/fulltextpdf.php?mno=30071> (Accessed: 30 April 2020).

Divers, S.J. and Stahl, S.J. (2019) *Mader’s Reptile and Amphibian Medicine and Surgery*. Third edition. St. Louis: Elsevier Health Sciences.

El-Mansoury, A.M., Hamooda, E.A.F. and Mehdi, A.R. (2014) ‘Some Blood Indexes of the Tortoise Testudo graeca Linn., 1758, From Benghazi Province, Libya’ [en ligne], *Scientific Research Journal*, 2(9), pp. 36–44. Available at: https://www.academia.edu/8822430/Some_Blood_Indexes_of_the_Tortoise_Testudo_graeca_Linn_1758_From_Benghazi_Province_Libya (Accessed: 29 September 2020).

Estridge, B.H. and Reynolds, A.P. (2012) *Basic clinical laboratory techniques - 6th edition*. Clifton Park, NY: Delmar Cengage Learning.

Estridge, B.H., Reynolds, A.P. and Walters, N.J. (2000) *Basic Medical Laboratory Techniques - Fourth Edition*. Delmar Publishers (Medical Lab Technician Series).

EUR-Lex (no date) *L'accès au droit de l'Union Européenne*. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/1997/338/2013-08-10?locale=fr#> (Accessed: 17 December 2020).

Flower, J.E. *et al.* (2015) 'Baseline plasma corticosterone, haematological and biochemical results in nesting and rehabilitating loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*)' [en ligne], *Conservation Physiology*, 3, pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1093/conphys/cov003> (Accessed: 30 September 2020).

Fudge, A.M. (ed.) (2000) *Laboratory medicine: avian and exotic pets*. Philadelphia: Saunders.
Gottdenker, N.L. and Jacobson, E.R. (1995) 'Effect of venipuncture sites on hematologic and clinical biochemical values in desert tortoises (*Gopherus agassizii*)' [en ligne], *American Journal of Veterinary Research*, 56(1), pp. 19–21. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7695143/> (Accessed: 4 May 2020).

Groulade, P. and Guelfi, J. (1983) 'Chapitre 1 : Frottis sanguins', in *Atlas d'hématologie et de cytologie du chien et du chat*. C.N.V.S.P.A.

Harr, K.E., Raskin, R.E. and Heard, D.J. (2005) 'Temporal effects of 3 commonly used anticoagulants on hematologic and biochemical variables in blood samples from macaws and Burmese pythons' [en ligne], *Veterinary Clinical Pathology*, 34(4), pp. 383–388. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2005.tb00065.x> (Accessed: 1 May 2020).

Hernandez-Divers, S.M., Hernandez-Divers, S.J. and Wyneken, J. (2002) 'Angiographic, anatomic and clinical technique descriptions of a subcarapacial venipuncture site for Chelonians' [en ligne], *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 12(2), pp. 32–37. Available at: <http://jherpmedsurg.com/doi/10.5818/1529-9651.12.2.32> (Accessed: 4 May 2020).

Hidalgo-Vila, J. *et al.* (2011) 'Pancreatitis associated with the Helminth *Serpinema microcephalus* (Nematoda: Camallanidae) in Exotic Red-Eared Slider Turtles (*Trachemys scripta elegans*)' [en ligne], *Journal of Wildlife Diseases*, 47(1), pp. 201–205. Available at: <https://meridian.allenpress.com/jwd/article/47/1/201/121163/Pancreatitis-Associated-with-the-Helminth> (Accessed: 12 October 2020).

Innis, C. *et al.* (2010) 'A call for additional study of the safety of subcarapacial venipuncture in chelonians' [en ligne], *Proceedings Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, pp. 8–10. Available at: https://www.researchgate.net/publication/290483862_A_call_for_additional_study_of_the_safety_of_subcarapacial_venipuncture_in_chelonians (Accessed: 3 May 2020).

Interchim, Innova Biosciences and Chromocyte (no date) *Guide du débutant : cytométrie en flux*. Available at: <https://www.interchim.fr/cat/Guide%20du%20debutant-cytometrie%20en%20flux%20-%20Interchim.pdf> (Accessed: 11 December 2020).

Jacobson, E.R. (ed.) (2007) *Infectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text*. Boca Raton, Fla.: Taylor & Francis.

Jacobson, E.R. and Garner, M. (2020) *Infectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text*. Boca Raton: CRC Press.

Jacobson, E.R., Schumacher, J. and Green, M. (1992) 'Field and clinical techniques for sampling and handling blood for hematologic and selected biochemical determinations in the Desert Tortoise, *Xerobates agassizii*' [en ligne], *Copeia*, 1992(1), p. 237. Available at: <https://www.jstor.org/stable/1446559?origin=crossref> (Accessed: 2 May 2020).

Kassab, A., Shousha, S. and Fargani, A. (2009) 'Morphology of blood cells, liver and spleen of the Desert Tortoise (*Testudo graeca*)' [en ligne], *The Open Anatomy Journal*, 1, pp. 1–10. Available at: <http://benthamopen.com/ABSTRACT/TOANATJ-1-1> (Accessed: 30 April 2020).

Keilwerth, M. *et al.* (2012) 'Inclusion Body Disease (IBD of Boids), a haematological, histological and electron microscopical study' [en ligne], *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 125, pp. 411–7. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23045804/> (Accessed: 12 October 2020).

Kirchgessner, M. and Mitchell, M.A. (2009) 'Chapter 9 - Chelonians', in Mitchell, M.A. and Tully, T.N. (eds) *Manual of Exotic Pet Practice*. Saint Louis: W.B. Saunders, pp. 207–249.

Lawrence, K. and Hawkey, C. (1986) 'Seasonal variations in haematological data from Mediterranean tortoises (*Testudo graeca* and *Testudo hermanni*) in captivity' [en ligne], *Research in Veterinary Science*, 40(2), pp. 225–230. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528818305174> (Accessed: 1 May 2020).

Le Net, R. (2015) *Contribution à l'établissement d'intervalles de référence en biochimie sanguine chez la Tortue d'Hermann, Testudo hermanni*. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine, Nantes.

Légifrance (no date) *Arrêté du 8 octobre 2018 fixant les règles générales de détention d'animaux d'espèces non domestiques*. Available at: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000037491137/> (Accessed: 17 December 2020).

Lillywhite, H.B. and Smits, A.W. (1984) 'Lability of blood volume in snakes and its relation to activity and hypertension' [en ligne], *The Journal of Experimental Biology*, 110, pp. 267–274. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6747537/> (Accessed: 10 May 2020).

López-Olvera, J.R. *et al.* (2003) 'Effect of venipuncture site on hematologic and serum biochemical parameters in marginated tortoise, *Testudo Marginata*' [en ligne], *Journal of Wildlife Diseases*, 39(4), pp. 830–836. Available at: <http://www.jwildlifedis.org/doi/10.7589/0090-3558-39.4.830> (Accessed: 30 April 2020).

Mader, D.R. (ed.) (2006) *Reptile medicine and surgery*. 2. ed. St. Louis, Mo: Saunders Elsevier.
Mans, C. (2008) 'Venipuncture techniques in chelonian species' [en ligne], *Lab Animal*, 37(7), pp. 303–304. Available at: <http://www.nature.com/articles/laband0708-303> (Accessed: 4 May 2020).

Martínez-Silvestre, A. *et al.* (2002) 'Venipuncture technique of the occipital venous sinus in Freshwater Aquatic Turtles' [en ligne], *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 12(4), pp. 31–32. Available at: <http://jherpmedsurg.com/doi/10.5818/1529-9651.12.4.31> (Accessed: 5 May 2020).

Mathes, K., Holz, A. and Fehr, M. (2006) 'Blood reference values of terrestrial tortoises (*Testudo* spp.) kept in Germany' [en ligne], *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere*, 34, pp. 268–274. Available at: https://www.researchgate.net/publication/287767028_Blood_reference_values_of_terrestrial_tortoises_Testudo_spp_kept_in_Germany (Accessed: 30 September 2020).

McArthur, S., Wilkinson, R. and Meyer, J. (2004) *Medicine and surgery of tortoises and turtles*. Oxford ; Malden, MA: Blackwell Pub.

Mead, K., Borysenko, M. and Findlay, S. (1983) 'Naturally abundant basophils in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*, possess cytophilic surface antibody with reaginic function' [en ligne], *Journal of immunology*, 130(1), pp. 334–240. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6183356/> (Accessed: 7 May 2020).

Medeiros, N.C. *et al.* (2012) 'Effect of the blood collection site on the hematological parameters in red-eared slider, *Trachemys scripta elegans*' [en ligne], *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(suppl 1), pp. 37–40. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2012001300008&lng=pt&tlng=pt (Accessed: 5 May 2020).

Meints, R.H. *et al.* (1975) 'Erythropoietic activity in the turtle: The influence of hemolytic anemia, hypoxia and hemorrhage on hemopoietic function' [en ligne], *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 50(2), pp. 419–422. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0300962975900365> (Accessed: 6 May 2020).

Mihalca, A.D. *et al.* (2008) 'Prevalence and intensity of blood apicomplexan infections in reptiles from Romania' [en ligne], *Parasitology Research*, 102(5), pp. 1081–1083. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00436-008-0912-9> (Accessed: 14 October 2020).

de Moerloose, P. and Boehlen, F. (2005) *Cours hémostase - Service d'Angiologie et Hémostase, Hôpitaux Universitaire et Faculté de Médecine de Genève*. Available at: http://www.medecine.unige.ch/enseignement/apprentissage/module2/circ/apprentissage/intranet/pb2/hemostase_polycop.pdf (Accessed: 7 May 2020).

Montali, R.J. (1988) 'Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals)' [en ligne], *Journal of Comparative Pathology*, 99(1), pp. 1–26. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0021997588901016?via%3Dihub> (Accessed: 9 May 2020).

Mumm, L.E. *et al.* (2019) ‘Hematology and plasma biochemistries in the Blanding’s turtle (*Emydoidea blandingii*) in Lake County, Illinois’ [en ligne], *PloS One*, 14(11), pp. 1–15. Available at: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0225130> (Accessed: 30 April 2020).

Muñoz, F.A. *et al.* (2014) ‘Characterisation of the green turtle’s leukocyte subpopulations by flow cytometry and evaluation of their phagocytic activity’ [en ligne], *Veterinary Research Communications*, 38(2), pp. 123–128. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11259-014-9595-0> (Accessed: 14 December 2020).

Nardini, G., Leopardi, S. and Bielli, M. (2013) ‘Clinical Hematology in Reptilian Species’ [en ligne], *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 16(1), pp. 1–30. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1094919412000849> (Accessed: 30 April 2020).

Nevill, H. (2009) ‘Diagnosis of nontraumatic blood loss in birds and reptiles’ [en ligne], *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18(2), pp. 140–145. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1557506309000494> (Accessed: 7 May 2020).

Nkrumah, B. *et al.* (2011) ‘Hemoglobin estimation by the HemoCue® portable hemoglobin photometer in a resource poor setting’ [en ligne], *BMC Clinical Pathology*, 11(1), p. 5. Available at: <https://bmcclinpathol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6890-11-5> (Accessed: 26 October 2020).

Orkun, O. and Guven, E. (2012) ‘A new species of Haemoproteus from a Tortoise (*Testudo graeca*) in Turkey, with remarks on molecular phylogenetic and morphological analysis’ [en ligne], *The Journal of parasitology*, 99, pp. 112–117. Available at: <http://www.bioone.org/doi/full/10.1645/GE-3100.1> (Accessed: 14 October 2020).

Pellett, S. and Cope, I. (2013) ‘Visual identification of reptiles: part 1–chelonina’ [en ligne], *Companion Animal*, 18(7), pp. 342–347. Available at: <https://www.magonlinelibrary.com/doi/abs/10.12968/coan.2013.18.7.342> (Accessed: 29 October 2020).

Perpiñan, D. *et al.* (2006) ‘Comparison of three different techniques to produce blood smears from Green Iguanas, *Iguana iguana*’ [en ligne], *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 16(3), pp. 99–101. Available at: <http://jherpmedsurg.com/doi/10.5818/1529-9651.16.3.99> (Accessed: 16 May 2020).

Petersen, A. (2016) *Influence of blood storage time and temperature on the evaluation of blood smears from Hermann’s Tortoises (*Testudo hermanni*)*. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté médecine vétérinaire de Munich.

Petit, X. (2014) *La contention et la réalisation de prélèvements en vue d’examen complémentaires chez les reptiles : réalisation d’un CD-ROM interactif*. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon.

Redrobe, S. and MacDonald, J. (1999) 'Sample Collection and Clinical Pathology of Reptiles' [en ligne], *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 2(3), pp. 709–730. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1094919417301184> (Accessed: 1 May 2020).

Rousselet, E. *et al.* (2013) 'Hematology and plasma biochemistry analytes in five age groups of immature, captive-reared loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*)' [en ligne], *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 44(4), pp. 859–874. Available at: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1638/2012-0162R1.1> (Accessed: 29 September 2020).

Saggese, M.D. (2009) 'Clinical approach to the anemic reptile' [en ligne], *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18(2), pp. 98–111. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1557506309000421> (Accessed: 30 April 2020).

Samour, J. *et al.* (2016) 'Chapter 6 - Clinical and Laboratory Diagnostic Examination', in Samour, J. (ed.) *Avian Medicine (Third Edition)*. Mosby, pp. 73–178.

Schilliger, L. (2007) *Les tortues de jardin: guide des soins & des maladies*. Mouleydier: Animalia éd.

Seliger, C. *et al.* (2012) 'A rapid high-precision flow cytometry based technique for total white blood cell counting in chickens' [en ligne], *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 145(1), pp. 86–99. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016524271100417X> (Accessed: 15 December 2020).

Sheldon, J.D. *et al.* (2016) 'Comparison of total leukocyte quantification methods in free-living galapagos tortoises' [en ligne], *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 47(1), pp. 196–205. Available at: <http://www.bioone.org/doi/10.1638/2015-0159.1> (Accessed: 4 May 2020).

Široký, P. *et al.* (2009) 'Co-distribution Pattern of a Haemogregarine *Hemolivia mauritanica* (Apicomplexa: Haemogregarinidae) and Its Vector *Hyalomma aegyptium* (Metastigmata: Ixodidae)' [en ligne], *Journal of Parasitology*, 95(3), pp. 728–733. Available at: <https://doi.org/10.1645/GE-1842.1> (Accessed: 14 October 2020).

Soler, J., Martinez Silvestre, A. and Sempere, M. (2009) 'Testudo graeca ibera en Rumania' [en ligne], *Reptilia*, 77, pp. 43–49. Available at: https://www.researchgate.net/publication/260435639_Testudo_graeca_ibera_en_Rumania (Accessed: 30 October 2020).

Stacy, N.I., Alleman, A.R. and Sayler, K.A. (2011) 'Diagnostic hematology of reptiles' [en ligne], *Clinics in Laboratory Medicine*, 31(1), pp. 87–108. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0272271210001484?via%3Dihub> (Accessed: 30 April 2020).

Sykes, J.M. and Klaphake, E. (2015) 'Reptile hematology' [en ligne], *The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice*, 18(1), pp. 63–82. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S109491941400067X?via%3Dihub> (Accessed: 30 April 2020).

Sysmex Corporation (2015) ‘Analyseur automatique d’hématologie XT-2000i/XT-1800i, mode d’emploi’.

Sysmex France (no date) *Impédance et focalisation hydrodynamique*. Available at: <https://www.sysmex.fr/n/academie/centre-dexpertise/technologie-sysmex/impedance-et-focalisation-hydrodynamique.html> (Accessed: 23 September 2021).

Thrall, M.A. *et al.* (2012) *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. 2nd edition. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.

Tosunoglu, M., C. Varol Tok and Cigdem Gul (2005) ‘Hematological Values in Hermann’s Tortoise (*Testudo hermanni*) and Spur-thighed Tortoise (*Testudo graeca*) from Thrace Region (Turkey)’ [en ligne], *International Journal of Zoological Research*, 1(1), pp. 11–14. Available at: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=ijzr.2005.11.14> (Accessed: 29 September 2020).

Tsai, C.-Y. *et al.* (2014) ‘An alternative staining method for counting red-eared slider turtle (*Trachemys scripta*) blood cells using crystal violet in cells diluted with 0.45% sodium chloride’ [en ligne], *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 26(5), pp. 610–615. Available at: <https://doi.org/10.1177/1040638714542868> (Accessed: 22 July 2020).

Uğurtaş, I.H., Sevinç, M. and Yildirimhan, H. (2003) ‘Erythrocyte size and morphology of some tortoises and turtles from Turkey’ [en ligne], *Zoological Studies*, 42, pp. 173–178. Available at: <https://www.semanticscholar.org/paper/Erythrocyte-Size-and-Morphology-of-Some-Tortoises-Ugurtas-Sevinç/2c5ee5b2372316d650a8ad1d4b32a0d665fe7e69> (Accessed: 5 October 2020).

Vasse, J. and Beaupain, D. (1981) ‘Erythropoiesis and haemoglobin ontogeny in the turtle *Emys orbicularis*’ [en ligne], *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 62(1), p. 129. Available at: <http://dev.biologists.org/content/62/1/129.abstract> (Accessed: 6 May 2020).

Vitt, L.J. and Caldwell, J.P. (2014) ‘Chapter 2 - Anatomy of Amphibians and Reptiles’, in *Herpetology (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press, pp. 35–82.

Wickramasinghe, S.N., Shiels, S. and Wickramasinghe, P.S. (2008) ‘Immunoreactive Erythropoietin in Teleosts, Amphibians, Reptiles, and Birds’ [en ligne], *Annals of the New York Academy of Sciences*, 718(1), pp. 366–370. Available at: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1749-6632.1994.tb55742.x> (Accessed: 6 May 2020).

Willemsen, R. and Hailey, A. (2003) ‘Sexual dimorphism of body size and shell shape in European tortoises’ [en ligne], *Journal of Zoology (London)*, 260, pp. 353–365. Available at: <https://zslpublications.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1017/S0952836903003820> (Accessed: 30 October 2020).

Winter, J.M. *et al.* (2019) ‘Investigating the analytical variability and agreement of manual leukocyte quantification methods in Eastern Box Turtles (*Terrapene carolina carolina*)’ [en ligne], *Frontiers in Veterinary Science*, 6, pp. 1–9. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2019.00398/full> (Accessed: 30 April 2020).

Work, T. and Balazs, G. (1999) 'Relating tumor score to hematology in Green Turtles with fibropapillomatosis in Hawaii' [en ligne], *Journal of wildlife diseases*, 35, pp. 804–7. Available at: <https://meridian.allenpress.com/jwd/article/35/4/804/121087/Relating-Tumor-Score-to-Hematology-in-Green> (Accessed: 7 October 2020).

Zimmerman, L.M. *et al.* (2010) 'Phagocytic B cells in a reptile' [en ligne], *Biology Letters*, 6(2), pp. 270–273. Available at: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsbl.2009.0692> (Accessed: 7 May 2020).

Zwart, P. (2018) 'The lymph system in reptiles: an orientation' [en ligne], *Conference: Meeting of the force task group Diseases of reptiles and amphibians of the DGHT - Leipzig*, pp. 25–41. Available at: https://www.researchgate.net/profile/Peernel-Zwart/publication/330216221_The_Lymph_system_in_reptiles_an_orientation/links/5c34850f92851c22a363bf1f/The-Lymph-system-in-reptiles-an-orientation.pdf (Accessed: 5 May 2020).

ANNEXES

Annexe 1 : dimensions et tailles moyennes des érythrocytes obtenues dans l'étude de Uğurtaş et al. chez des tortues grecques (Uğurtaş, Sevinç and Yildirimhan, 2003)

Paramètre N=9	Moyenne	Min - Max	SD
Longueur érythrocytes (µm)	18,29	15,86 – 20,13	0,76
Largeur érythrocytes (µm)	11,35	10,37 – 12,81	0,54
Rapport longueur/largeur	1,61	1,42 – 1,83	0,08
Taille érythrocytes (µm ²)	163,00	129,10 – 202,40	11,84
Longueur noyau (µm)	7,34	6,10 – 9,15	0,56
Largeur noyau (µm)	4,96	4,27 – 6,10	0,54
Rapport longueur/largeur noyau	1,49	1,10 – 2,14	0,20
Taille noyau (µm ²)	28,60	20,45 – 39,43	3,73
Rapport nucléo-plasmique	0,17	0,13 - 0,22	0,02

Annexe 2 : dimensions et tailles moyennes des cellules sanguines obtenues dans l'étude de Tosunoglu et al. chez des tortues grecques (Tosunoglu, 2005)

Paramètre N=7	Moyenne	Min - Max	SD	
Longueur érythrocytes (µm)	17,93	16,26 – 19,31	0,96	
Largeur érythrocytes (µm)	9,86	9,25 – 10,62	0,42	
Taille érythrocytes (µm ²)	139,38	118,19 – 161,53	13,48	
Longueur noyau (µm)	5,67	5,39 – 6,00	0,25	
Largeur noyau (µm)	3,44	2,92 – 3,87	0,34	
Taille noyau (µm ²)	15,54	12,53 – 18,32	2,02	
Rapport longueur/largeur	1,81	1,77 – 1,87	/	
Rapport longueur/largeur noyau	1,64	1,50 – 1,87	0,13	
Rapport nucléo-plasmique	9,38	8,01 – 11,38	1,24	
Diamètre lymphocytes (µm)	Petit lymphocyte	7,80	7,37 – 8,12	0,85
	Grand pymphocyte	11,28	10,50 – 12,87	0,24
Diamètre monocytes (µm)	13,37	11,56 – 15,00	1,17	
Diamètre éosinophiles (µm)	12,17	10,62 – 13,56	0,96	
Diamètre basophiles (µm)	9,10	8,25 – 10,00	0,63	
Longueur thrombocytes (µm)	8,92	7,37 – 9,87	0,79	
Largeur thrombocytes (µm)	4,81	4,00 – 5,25	0,51	

Annexe 3 : dimensions et tailles moyennes des cellules sanguines obtenues dans l'étude de Kassab et al. chez des tortues grecques (Kassab, Shousha and Fargani, 2009)

P	Confidence Interval (95%)	SD	Mean	N	Sex	Variable
0.279	18.2122 - 19.3274	±2.8100	18.7698	100	M	Erythrocytes Length (μ)
	18.6231 - 19.7749	±2.9024	19.1990	100	F	
0.077	9.0829 - 9.9691	±2.2331	9.5260	100	M	Erythrocytes Width (μ)
	9.3430 - 10.3390	±2.5096	9.8410	100	F	
0.128	5.9777 - 6.3031	±0.8199	6.1404	100	M	Nuclear Length (μ)
	6.1617 - 6.4871	±0.8200	6.3244	100	F	
0.008*	4.2710 - 4.6234	±0.8880	4.4472	100	M	Nuclear Width (μ)
	4.6178 - 4.9702	±0.8878	4.7940	100	F	
0.128	130.6241 - 150.2081	±49.3495	140.4161	100	M	Erythrocytes Size (μ ²)
	141.1660 - 162.9880	±54.9891	142.0770	100	F	

*P value of less than 0.05 indicates a significant difference between the compared means of male and female tortoises.

Tableau 1 : dimensions moyennes des érythrocytes et des noyaux d'érythrocytes et taille moyenne des érythrocytes chez les mâles et femelles *Testudo graeca*

P	Confidence Interval (95%)	SD	Mean	No. Cells	Sex	Variable
0.959	14.5132 - 16.5501	± 2.7275	15.5317	30	M	Heterophil Length (μ)
	14.5470 - 16.4317	± 2.5236	15.4893	30	F	
0.396	12.5229 - 14.4691	± 2.6061	13.4960	30	M	Heterophil Width (μ)
	11.9334 - 13.8312	± 2.5412	12.8823	30	F	
0.396	150.837-194.6023	±58.6019	172.7200	30	M	Heterophil Size (μ ²)
	138.668-175.4446	±49.2439	167.0567	30	F	

Tableau 2 : dimensions et taille moyennes des hétérophiles chez les mâles et femelles *Testudo graeca*

P	Confidence Interval (95%)	SD	Mean	No. Cells	Sex	Variable
0.516	13.9055- 15.0585	±1.5439	14.482	30	M	Eosinophils Length (μ)
	13.5183- 14.8717	±1.8122	14.195	30	F	
0.323	10.0895- 11.3645	±1.7072	10.727	30	M	Eosinophils Width (μ)
	8.2145 - 17.9602	±1.3049	10.087	30	F	
0.514	113.041- 132.6403	±26.2439	122.840	30	M	Eosinophils Size (μ ²)
	107.614- 129.0645	±28.7226	118.339	30	F	

Tableau 3 : dimensions et taille moyennes des éosinophiles chez les mâles et femelles *Testudo graeca*

P	Confidence Interval (95%)	SD	Mean	No. Cells	Sex	Variable
0.098	11.8076 - 12.5704	±1.0214	12.1890	30	M	Basophils length(μ)
	12.1327 - 12.9893	±1.1469	12.5610	30	F	
0.103	11.5459 - 12.2801	±.9831	11.913.	30	M	Basophils Width(μ)
	11.8255 - 12.7105	±1.1849	12.2680	30	F	
0.087	107.8658-121.927	±18.8289	114.8967	30	M	Basophils Size (μ ²)
	113.755- 130.231	±22.0619	121.9933	30	F	

Tableau 4 : dimensions et taille moyennes des basophiles chez les mâles et femelles *Testudo graeca*

P	Confidence Interval (95%)	SD	Mean	No. Cells	Sex	Variable
0.100	8.3452 - 9.9728	±2.1794	9.1590	30	M	Lymphocytes Length (μ)
	9.1898 - 11.0102	±2.4377	10.1000	30	F	
0.055	7.0388 - 8.3688	±1.7778	7.7027	30	M	Lymphocytes Width (μ)
	7.9072 - 9.5195	±2.1590	8.7133	30	F	
0.047	47.9936 - 68.3131	±27.2083	58.1533	30	M	Lymphocytes Size (μ ²)
	60.7868 - 85.3065	±32.0832	73.0467	30	F	

Tableau 5 : dimensions et taille moyennes des lymphocytes chez les mâles et femelles *Testudo graeca*

P	Confidence Interval (95%)	SD	Mean	No. Cells	Sex	Variable
0.639	13.7219 - 15.618	±2.5399	14.6703	30	M	Monocytes length(μ)
	13.9320 - 16.052	±2.8387	14.9920	30	F	
0.227	9.5126 - 11.0494	±2.0578	10.2810	30	M	Monocytes Width (μ)
	10.1954 - 11.642	±1.9378	10.9190	30	F	
0.625	99.8959 - 136.74	±49.3461	118.3220	30	M	Monocytes Size (μ ²)
	103.349 - 148.14	±59.9797	125.7467	30	F	

Tableau 6 : dimensions et taille moyennes des monocytes chez les mâles et femelles *Testudo graeca*

P	Confidence Interval (95%)	SD	Mean	No. cells	Sex	Variable
0.682	5.8425 - 6.5335	±0.9253	6.1880	30	M	Thrombocytes Length (μ)
	5.9146 - 6.6654	±1.0052	6.2900	30	F	
0.887	4.2328 - 4.9472	±0.9565	4.5900	30	M	Thrombocytes Width (μ)
	4.2401 - 5.0079	±1.0282	4.620	30	F	
0.776	20.035 - 25.367	±7.1405	22.7013	30	M	Thrombocytes Size (μ ²)
	20.381 - 26.055	±7.5972	23.2187	30	F	

Tableau 7 : dimensions et taille moyennes des thrombocytes chez les mâles et femelles *Testudo graeca*

Annexe 4 : dimensions et tailles moyennes des cellules sanguines obtenues dans l'étude de Arikan et al. chez des tortues grecques (Arikan et al., 2015)

Paramètre N=9		Moyenne	Min - Max	SD
Longueur érythrocytes (µm)		17,5	11,7 – 21,0	2,07
Largeur érythrocytes (µm)		11,8	9,3 – 16,3	1,59
Taille érythrocytes (µm ²)		163,1	85,2 – 249,3	33,76
Longueur noyau (µm)		6,1	4,7 – 7,0	0,75
Largeur noyau (µm)		4,9	3,5 – 7,0	0,61
Taille noyau (µm ²)		23,2	12,8 – 38,4	4,83
Rapport longueur/largeur noyau		1,3	1,0 – 2,0	0,19
Rapport nucléo-plasmique		0,1	0,1 – 0,3	0,04
Diamètre lymphocytes	Petit lymphocyte	9,1	8,3 – 10,3	0,68
	Grand pymphocyte	12,1	11,5 – 13,0	0,80
Diamètre monocytes (µm)		12,0	11,3 – 13,0	0,59
Diamètre éosinophiles (µm)		12,5	11,3 – 15,0	1,06
Diamètre basophiles (µm)		10,9	10,3 – 11,5	0,42
Diamètre hétérophiles (µm)		9,8	9,5 – 10,0	0,35
Longueur thrombocytes (µm)		12,6	11,5 – 13,8	0,79
Largeur thrombocytes (µm)		7,4	6,5 – 8,8	0,74
Longueur noyau thrombocytes (µm)		9,0	8,5 – 10,0	0,45
Largeur noyau thrombocytes (µm)		7,2	6,5 – 8,8	0,74

Annexe 5 : résultats obtenus dans l'étude de Lawrence et al. (Lawrence and Hawkey, 1986)

Mois	Paramètres	Veine coccygienne Moyenne ± SD	Coupe de griffe Moyenne ± SD
Janvier (n=12)	Hb (g/dL)	9,0 ±0,9	9,3 ±1,5
	RBC (10 ¹² /L)	0,81±0,13	0,76±0,16
	PCV (litres/litre)	0,33±0,08	0,32±0,06
Mars (n=6)	Hb (g/dL)	10,25±1,0	10,1 ±0,7
	RBC (10 ¹² /L)	0,86±0,31	0,82±0,15
	PCV (litres/litre)	0,37±0,09	0,34±0,05

Tableau 1 : comparaison des paramètres de la lignée rouge obtenus en fonction du site de prélèvement chez les tortues grecques

Aucune différence significative n'a été objectivée entre ces 2 sites de prélèvements.

	January			March			June		
	Mean	±SD	Range	Mean	±SD	Range	Mean	±SD	Range
<i>T. graeca</i> n = 12									
Hb (g dl ⁻¹)	9.3	± 1.5	(7.1 – 13.0)	10.1	± 0.7	(8.75– 12.75)	9.1	± 1.4	(6.5 – 12.25)
RBC (10 ¹² litre ⁻¹)	0.76	± 0.16	(0.54– 0.96)	0.82	± 0.15	(0.65– 1.08)	0.67	± 0.12	(0.46– 0.84)
PCV(litres litre ⁻¹)	0.32	± 0.06	(0.24– 0.45)	0.34	± 0.05	(0.28– 0.42)	0.28	± 0.28	(0.2 – 0.35)
MCV (fl)	416.0	±15.0	(350.2 –444.4)	422.9	±31.9	(365.2 –491.8)	427.0	±16.3	(402.7 –462.9)
MCH (pg)	124.0	±14.2	(105.2 –148.1)	126.3	±18.1	(89.56–159.8)	137.3	± 8.1	(125.0 –152.7)
MCHC (g dl ⁻¹)	29.8	± 2.9	(25.35– 34.4)	29.8	± 3.1	(24.52– 33.3)	32.2	± 2.1	(29.2 – 35.0)
WBC (10 ⁹ litre ⁻¹)	8.5	± 2.2	(5.4 – 12.85)	5.1	± 2.3	(1.5 – 13.0)	7.1	± 1.6	(5.5 – 12.5)
October									
Mean	±SD	Range	November			December			
			Mean	±SD	Range	Mean	±SD	Range	
			n = 14			n = 14			
9.0	± 1.3	(6.5 – 11.0)	9.5	± 1.3	(6.0 – 11.3)	<4.0			
0.64	± 0.10	(0.47– 0.77)	0.68	± 0.10	(0.48– 0.83)	0.25	± 0.09	(0.11– 0.38)	
0.27	± 0.04	(0.18– 0.33)	0.29	± 0.04	(0.24– 0.37)	0.14	± 0.05	(0.06– 0.20)	
428.8	±26.0	(378.9 –490.2)	426.6	±22.3	(382.7 –461.5)	557.3	±66.1	(500.0 –720.0)	
140.3	± 9.6	(125.0 –156.8)	140.3	±10.9	(123.4 –158.7)	—	—	—	
32.8	± 2.6	(30.0 – 36.20)	32.6	± 2.7	(29.7 – 37.0)	—	—	—	
9.3	± 2.5	(7.0 – 14.0)	—	—	—	—	—	—	

Tableau 2 : paramètres hématologiques en fonction du mois de prélèvement chez des tortues grecques

	January n = 10			March n = 8			June n = 6			October n = 8		
	Mean	±SD	Range	Mean	±SD	Range	Mean	±SD	Range	Mean	±SD	Range
Heterophils (%)	66	±13	(42–83)	63	±27	(12–83)	58	±16	(34–80)	43	±14	(16–56)
Lymphocytes (%)	33	±13	(15–58)	24	±12	(12–50)	41	±16	(20–64)	41	± 8	(29–52)
Monocytes (%)	0.4	—	(0–2)	2	± 3	(0–10)	0.7	± 1	(0–2)	1	± 1	(0–4)
Eosinophils (%)	0.6	—	(0–2)	11	±14	(0–30)	0.3	± 2	(0–5)	15	±16	(0–50)
Heterophils (10 ⁹ litre ⁻¹)	5.82	±1.58	(3.15–8.72)	3.05	± 1.91	(0.42–5.40)	4.30	± 1.99	(1.87–4.80)	3.90	± 1.72	(1.36–7.28)
Lymphocytes (10 ⁹ litre ⁻¹)	2.96	±1.44	(1.20–5.28)	1.08	± 0.52	(0.32–1.93)	2.86	± 0.98	(1.20–3.91)	3.72	± 1.13	(2.18–5.60)
Monocytes (10 ⁹ litre ⁻¹)	0.02	±0.05	(0.00–0.16)	0.06	± 0.12	(0.00–0.35)	0.1	± 0.1	(0.00–0.20)	0.08	± 0.20	(0.00–0.56)
Eosinophils (10 ⁹ litre ⁻¹)	0.05	±0.10	(0.00–0.30)	0.46	± 0.61	(0.00–1.38)	0.06	± 0.13	(0.00–0.33)	1.30	± 1.38	(0.00–4.25)
Thrombocytes (10 ⁹ litre ⁻¹)	16.6	±9.8	(8.5–38.1)	12.2	±10.1	(1.00–23.8)	18.8	± 9.5	(11.8 –31.7)	16.2	± 8.1	(5.0 –26.8)
Heterophil:lymphocyte ratio	1.96			2.82			1.50			1.04		

Tableau 3 : paramètres hématologiques en fonction du mois de prélèvement chez une population de tortues d'Hermann et de tortues grecques

Les p-values et les différences significatives associées sont détaillées dans la partie 3 I.B.2.a)(2) consacrée à l'influence de la saison et de l'hibernation sur les paramètres hématologiques chez la tortue grecque.

Annexe 6 : paramètres hématologiques obtenus dans l'étude de Tosunoglu et al. chez des tortues grecques (Tosunoglu, 2005)

Paramètre N=5	Moyenne	Min - Max	SD
RBC (10⁹/L)	758,40	536,0 – 946,0	147,00
PCV (%)	28,80	24,0 – 36,0	4,43
Hb (g/dL)	7,22	5,2 – 9,7	1,66
MCV (fL)	383,80	360,0 – 447,7	36,59
MCH (pg)	94,05	80,0 – 100,0	7,99
MCHC (g/dL)	24,61	21,66 – 27,14	2,58
% lymphocytes	41,20	35,0 – 44,0	3,56
% monocytes	23,60	20,0 – 28,0	3,50
% basophiles	11,20	5,0 – 20,0	5,44
% éosinophiles	19,60	11,0 – 28,0	6,34

Annexe 7 : PCV obtenu dans l'étude de Mathes et al. chez des tortues grecques (Mathes, Holz and Fehr, 2006)

Paramètre	Valeur moyenne	Valeurs min-max
PCV (%) n= 15	23	17-35

Annexe 8 : paramètres hématologiques obtenus dans l'étude de El-Mansoury et al. en fonction du sexe chez des tortues grecques (El-Mansoury, Hamooda and Mehdi, 2014)

Paramètre	Sexe	N	Moyenne ± SD	Intervalle de confiance à 95%	P value
RBC (10 ⁶ /μL)	M	25	0,817 ± 0,245	0,715-0,918	0,0096*
	F	25	0,668 ± 0,126	0,615 – 0,720	
PCV (%)	M	25	27,72 ± 5,31	25,52 – 29,91	0,0024*
	F	25	23,68 ± 3,40	22,27 – 25,08	
Hb (g/dL)	M	25	8,04 ± 1,06	7,59 – 8,48	0,0078*
	F	25	7,32 ± 0,71	7,03 – 7,62	
MCV (fL)	M	25	354,28 ± 6,46	326,84 – 381,71	0,6340
	F	25	363,12 ± 3,99	336,70 – 389,53	
MCH (pg)	M	25	105,04 ± 4,72	94,83	0,2209
	F	25	113,04 ± 20,71	104,48 – 121,59	
MCHC (g/dL)	M	25	29,76 ± 4,96	27,70 -31,81	0,2310
	F	25	31,24 ± 3,53	29,77 – 32,70	

* différence significative entre les sexes ($p < 0,05$)

Annexe 9 : paramètres hématologiques obtenus dans l'étude de Ali et al. en fonction du sexe chez des tortues grecques (Ali et al., 2018)

Paramètre	Mâles		Femelles	
	Moyenne ± SD	Min-Max	Moyenne ± SD	Min-Max
RBC (10 ⁶ /μL)	0,78 ± 0,20*	0,5-1,24	0,49 ± 0,14	0,34 - 0,7
Hb (g/dL)	8,16 ± 2,23	5,3 - 13,4	7,42 ± 2,42	4,2 – 11,9
PCV (%)	27,61 ± 5,8*	18 - 37	20,25 ± 4,50	15- 27
MCV (fL)	347,65 ± 74,02	222,9 – 485,3	385,61 ± 71,1	314,2 – 523,8
MCH (pg)	118,03 ± 47,35	56,6 – 223,6	135,78 ± 39,3	87,1 – 182,3
MCHC (g/dL)	34,1 ± 8,9	22 – 51,1	36,11 ± 11,84	23 – 54
WBC (10 ³ /μL)	3,99 ± 2,18	1-8	3,5 ± 1,27	1,5 – 4,5

Tableau 1 : paramètres hématologiques chez des tortues grecques mâles et femelles

* différence significative importante avec les femelles ($p < 0,01$)

Paramètre	T. graeca cliniquement saines		Haut degré de parasitisme (>3000 œufs par gram)		Degré modéré de parasitisme (<3000 œufs par gram)	
	Moyenne ±SD	Min - Max	Moyenne ±SD	Min - Max	Moyenne ±SD	Min - Max
RBC (10⁶/μL)	0.68±0.23	0.34-1.24	0.50±0.09*	0,39 – 0,65	0,68 ± 0,16	0,31 – 0,89
Hb (g/dL)	8,26 ± 2,5	4,2 ± 13,4	6,2 ± 1,62*	4,2 - 8	7,66 – 1,99	5,3 – 10,2
PCV (%)	25,12 ± 6,40	15 - 37	20 ± 6,78	15 - 30	25,6 ± 6,5	18 - 33
MCV (fL)	355,6 ± 74,1	22,9 – 523,8	383,5 ± 56,53	327,2 – 461,5	362,72 ± 89,9	266,6 – 485,3
MCH (pg)	115,3 ± 42	56,6 – 223,6	120,4 ± 53,2	65,9 – 223,6	101,7 ± 20	77,9 – 136,2
MCHC (g/dL)	34,3 ± 8,22	22 - 51	32,82 ± 5,44	26,6 – 38,7	32,01 ± 5,4	26,5 – 39,3
WBC (10³/μL)	3,68 ± 1,9	1 - 8	3,39 ± 1,3	2 – 5,5	4,7 ± 2,04	1,75 ± 7,25
%lymphocytes	30,3 ± 6,85	14 - 41	34,2 ± 7,85	23 - 41	29,3 ± 2,9	25 – 34
%monocytes	25,03 ± 7,8	13 - 42	21,2 ± 9,7	14 - 42	32,4 ± 3,3*	28 - 36
%hétérophiles	40,44 ± 11,72	21 - 65	42,83 ± 12,73	25 - 62	31,3 ± 6,75*	21 – 43
%éosinophiles	5,87 ± 4,5	1 - 15	9 ± 5,56	4 - 15	8,2 ± 4,08	4 - 13
%basophiles	0,05 ± 0,2	0 - 1	0,25 ± 0,46	0 - 1	0	0

Tableau 2 : relation entre paramètres hématologiques et intensité de la contamination fécale par des œufs chez la tortue grecque

* différence significative par rapport aux tortues grecques cliniquement saines (p<0,05)

Méthodes d'analyse hématologique chez les reptiles : approche appliquée à la tortue grecque (*Testudo Graeca*) et évaluation d'un modèle de comptage établi au Sysmex XT2000i

Auteur

KAMMERER Pauline

Résumé

L'interprétation de l'hémogramme est délicate chez les reptiles car de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques influent sur les normes physiologiques. De par le caractère nucléé des érythrocytes et des thrombocytes, les analyses hématologiques reptiliennes sont difficiles et nécessitent des méthodes de comptage manuel. Ces techniques sont relativement complexes et chronophages c'est pourquoi elles sont rarement menées par les praticiens. A ce titre, ce travail propose dans un premier temps une revue de la littérature des techniques de réalisation, d'évaluation et d'interprétation de l'hémogramme chez les reptiles sains et malades, et plus particulièrement chez les tortues grecques. Dans une seconde partie, cette étude tente d'établir un modèle de comptage cellulaire via l'automate d'hématologie XT2000i® (Sysmex) chez la tortue grecque. Les techniques d'impédance et de cytométrie en flux sont ainsi mises en œuvre chez cinq individus et des réglages manuels de l'automate sont effectués. Le modèle est ensuite comparé aux méthodes d'analyse de référence à savoir la coloration de Natt-Herrick et la réalisation de frottis sanguins. L'automate ne permet pas d'établir des comptages cellulaires fiables et reproductibles qu'il s'agisse des érythrocytes, des leucocytes ou des thrombocytes. Ainsi, la réalisation de frottis sanguins reste indispensable pour l'établissement d'un hémogramme chez la tortue grecque mais également pour son interprétation. Les graphiques générés par le Sysmex permettent toutefois d'identifier différents contingents cellulaires et si pour l'heure la technologie ne permet pas de séparer ces populations du bruit de fond causé par les érythrocytes et thrombocytes nucléés, on peut espérer que les prochaines générations d'automates en seront capables.

Mots-clés

Reptiles, Tortue grecque, Hématologie, Hémogramme, Comptages, Morphologie cellulaire

Jury

Président du jury : **Professeur COLLARDEAU-FRACHON Sophie**
Directeur de thèse : **Professeur RAMERY Eve**
Premier assesseur : **Professeur BURONFOSSE Thierry**
Deuxième assesseur : **Professeur RENÉ MARTELLET Magalie**