

## Cycle biologique d'*Hepatozoon domerguei* ; discussion sur les caractères fondamentaux d'un cycle de Coccidie

I. LANDAU, J. C. MICHEL et A. G. CHABAUD

Laboratoire de Zoologie (Vers) associé au C.N.R.S.

Muséum National d'Histoire Naturelle, 57, rue Cuvier, F-75 Paris 5ème

E. R. BRYGOO

Institut Pasteur de Madagascar. B.P. 1274. Tananarive. République malgache

Reçu le 9 septembre 1971

### The Life-History of *Hepatozoon domerguei*; Comments on the Fundamental Characteristics of a Coccidian Life-Cycle

*Summary.* A detailed description of the life cycle of *H. domerguei* (sporogony, primary and secondary schizogony, endogeny) is given. Comparisons with other Coccidians such as *Toxoplasma* and *Klossiella* are made, and the authors' hypothesis concerning the life cycle is as follows: the fundamental cycle of a vertebrate coccidian is dual; the sporozoite gives rise simultaneously to (1) a schizogonic cycle with primary and secondary schizonts followed by a gametogony and (2) to cysts which divide by endogeny, remain latent in the tissues and are infective to predators. Both are responsible for the natural dissemination of the infection by two different mechanisms: a) the schizogonic cycle produces the gametocytes which initiate the sporogony. The oocysts develop inside a vector or are expelled by the host in the external environment. This is the pattern commonly described for the coccidians. b) the cysts spread the infection among predatory hosts also in two ways:—production of schizonts, gametocytes and oocytes (mechanism a)—production of new cysts at the same time (mechanism b). Even a host which is insusceptible to schizonts and blood forms can be a host for the latent cysts and become infective for other predators. The importance of the cysts varies with the parasite species: it is very important for *Toxoplasma* and *Hepatozoon*, probably non functional in *Klossiella* which is mainly a parasite of non predatory animals; the cysts may perhaps have disappeared from the cycles of some Coccidians when they lost their role in the natural transmission.

It is also suggested, after some preliminary results, that there are two different populations of oocysts, one of them being responsible for the later production of cysts.

*Résumé.* Le cycle biologique d'*Hepatozoon domerguei* (sporogonie, schizogonies primaire et secondaire, endogénie) est décrit en détail. D'autres Coccidies telles que *Toxoplasma* et *Klossiella* lui sont comparées et les auteurs proposent l'hypothèse suivante: Le cycle fondamental d'une Coccidie de Vertébré est double et comprend deux cycles dont la vitesse de développement est très différente mais tous deux

issus du sporozoïte: a) l'un, rapide, comprend plusieurs générations schizogoniques tissulaires et aboutit à la formation des gamétocytes qui sera suivie par la sporogonie. Il permet la transmission du parasitisme par un vecteur hématophage ou par le milieu extérieur. C'est le type de cycle habituellement décrit chez la plupart des Coccidies.

b) l'autre, après une phase de division par endogenèse, produit des formes d'attente ou kystes dont l'évolution ne peut se poursuivre que chez un deuxième hôte vertébré, prédateur, qui les ingère. Le kyste assure la dissémination de l'infection dans la nature par deux mécanismes: 1) l'animal prédateur qui a ingéré des kystes, fait, s'il est réceptif, à la fois une infection de type a) et une infection de type b). Il devient ainsi infectant pour le vecteur par ses gamétocytes et pour d'autres prédateurs par ses kystes; 2) certains prédateurs, peu réceptifs au cycle de type a) peuvent néanmoins héberger des kystes dans leurs tissus et transmettre ainsi le parasite lorsqu'ils sont ingérés à leur tour.

Les résultats d'expériences préliminaires suggèrent l'existence de deux populations différentes d'oocystes (grande et petite); seuls les grands seraient à l'origine des kystes.

Au cours d'un séjour à Madagascar, en février-mars 1969, nous avons examiné le sang de nombreux Reptiles, à l'Institut Pasteur de Tananarive. Plusieurs Serpents et Lézards étaient parasités par des Hémogrégarines. Des *Culex pipiens fatigans* et des *Anopheles stephensi* ont été gorgés sur certains d'entre eux. Une sporogonie de type *Hepatozoon* s'est développée chez ces vecteurs dans deux cas: 1) des *C. p. fatigans* gorgés sur un Colubridé, *Madagascarophis colubrina*; 2) des *A. stephensi* gorgés sur un Iguanidé, *Oplurus sebae*.

L'étude au laboratoire du cycle biologique du parasite de Serpent a permis de mettre en évidence (Landau et coll., 1970a et b) un double mode de transmission chez les *Hepatozoon*: 1) par ingestion de Culicidés; 2) par ingestion de proies contenant dans leurs organes des formes infectantes ou kystes<sup>1</sup>.

Dans cet article nous décrivons le cycle biologique d'*Hepatozoon domerguei* parasite de *M. colubrina* et nous relatons en détail les expériences de transmission effectuées au laboratoire.

### Matériels et Méthodes

*Souche*: L'histoire de la souche étudiée (173 LL) est résumée dans un tableau (fig. 1). Elle est issue d'un *Madagascarophis colubrina* (Schlegel, 1837) capturé par C. Domergue à Diego Suarez.

*Reptiles infectés expérimentalement*

5 Colubridés malgaches: 3 *Lioheterodon modestus* (Günther, 1863) et 2 *Madagascarophis colubrina*;

<sup>1</sup> La dénomination de kyste nous paraît plus appropriée que celle de pseudokyste que nous avons utilisé ailleurs (Landau, Michel, Chabaud et Brygoo, 1970b) car ces formes sont entourées d'une capsule résistante et sont comme les kystes de toxoplasme (Lainson, 1958) infectantes par voie orale.

18 *Python sebae*, tous de la même portée, capturés au Congo-Brazzaville alors qu'ils étaient âgés de moins de un mois;

5 *Oplurus sebae* de Madagascar;

11 *Lacerta muralis* de Fontainebleau;

1 *Lacerta vivipara* de Normandie;

1 *Lacerta sicula* italien.

Tous ces animaux, capturés dans la nature, étaient, au moment de leur contamination, indemnes de tout parasitisme sanguin.

*Vecteurs expérimentaux*

des *Culex pipiens fatigans* récoltés à l'état de larves ou d'œufs dans les mares des environs de Tananarive et éclos au laboratoire;

des *Culex pipiens fatigans*, souche de Dakar, élevés par J. Mouchet dans les laboratoires de l'ORSTOM à Bondy;

des *Anopheles stephensi* de nos élevages du Muséum.

*Culex* et *Anophèles* se sont gorgés sur les Reptiles dès le 3ème jour après l'éclosion des adultes. L'immobilisation des Lézards, au cours du repas des Moustiques a été nécessaire, celle des Serpents, par contre, inutile. Après le repas sanguin infectant, les Moustiques ont été maintenus à la température de 24—25° et nourris exclusivement avec une solution de glucose à 5%.

L'étude morphologique de la conjugaison, de la fécondation et des très jeunes oocystes a été faite sur frottis de corps gras, séchés à l'air, fixés par l'alcool méthylique et colorés par le Giemsa. La qualité de la fixation et de la coloration nous paraît bien meilleure lorsque les dissections sont effectuées à sec et non dans un liquide physiologique, même en petite quantité.

Le matériel histologique a été fixé par le Carnoy et conservé dans l'alcool butylique, les coupes ont été colorées par la méthode du Giemsa collophane.

## Description morphologique

### 1) Gamétocytes

Ils apparaissent vers le 23ème jour après la contamination chez les Pythons et les Oplures et vers le 40ème jour chez *Madagascarophis* et *Lioheterodon*.

La morphologie des gamétocytes dans le sang paraît être identique chez tous les hôtes étudiés. Au cours des premiers jours d'une parasitémie d'origine expérimentale, les gamétocytes sont courts, trapus, sans coque nette (fig. 2, 1 et 2). Le noyau occupe, en général, plus de la moitié

Fig. 1. Histoire de la souche 173 LL

<i>M. colubrina</i> = <i>Madagascarophis colubrina</i>	<i>I.O.</i> = Inoculation par ingestion d'organes
<i>O. sebae</i> = <i>Oplurus sebae</i>	<i>A 42</i> = Autopsie le 42ème jour
<i>L. modestus</i> = <i>Lioheterodon modestus</i>	<i>22 J</i> = 22 jours
<i>L. muralis</i> = <i>Lacerta muralis</i>	<i>BF</i> = Biopsie de foie
<i>L. viridis</i> = <i>Lacerta viridis</i>	<i>G</i> = Gamétocytes
<i>L. sicula</i> = <i>Lacerta sicula</i>	<i>S</i> = Schizontes
<i>C. p. fatigans</i> = <i>Culex pipiens fatigans</i>	<i>K</i> = kystes
<i>A. stephensi</i> = <i>Anopheles stephensi</i>	— = négatif



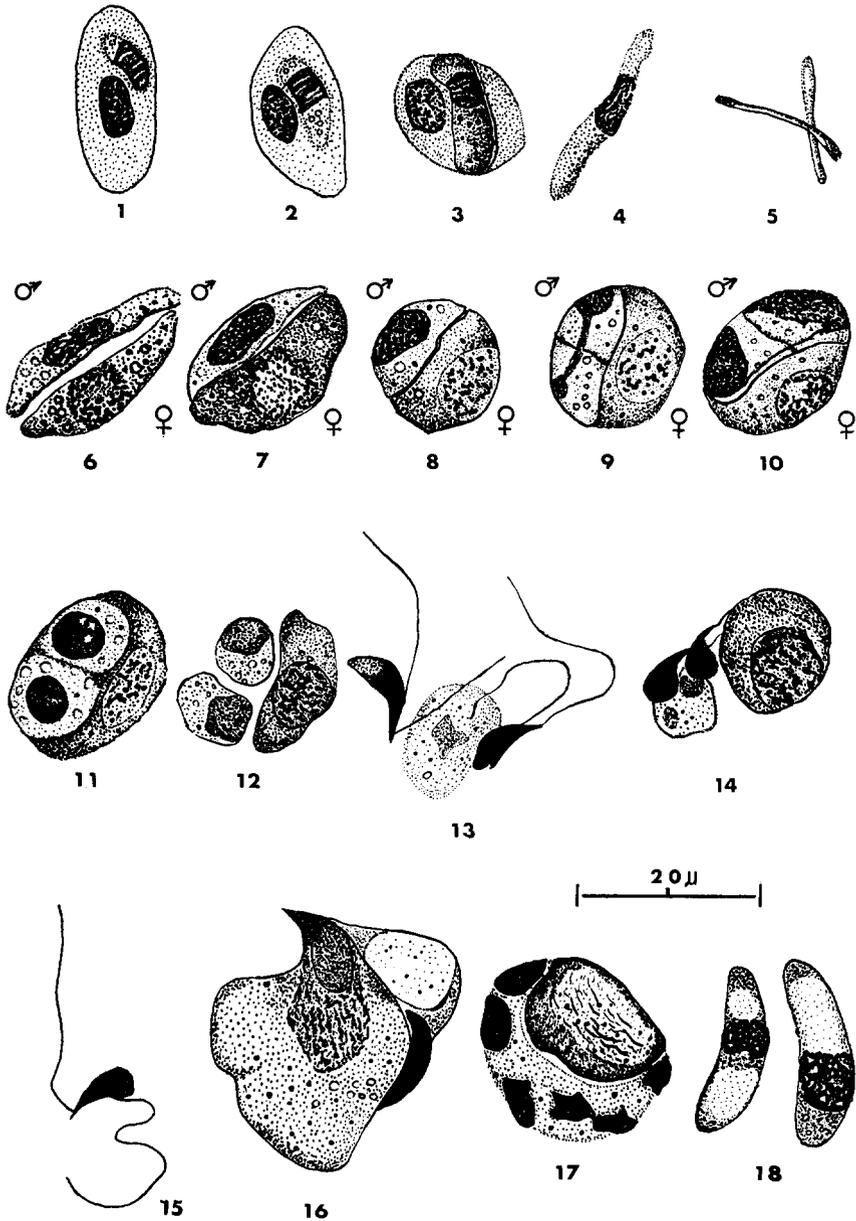


Fig. 2. Sporogonie d'*Hepatozoon domerquei*. 1—2 Jeunes gamétocytes dans un globe rouge; 3 gamétocyte encapsulé; 4 gamétocyte extra-cellulaire; 5 coque vide après la sortie d'un gamétocyte; 6, 7, 8 conjugaison; 9, 10, 11, 12 première division du gamétocyte mâle en deux cellules filles; 13, 14 formation de deux microgamètes

du parasite et est constitué par des rubans de chromatine transversaux. Le cytoplasme, clair, contient de petites vacuoles et quelques rares grains azurophiles.

En une à deux semaines ces gamétocytes immatures tendent à disparaître et sont remplacés par des formes comparables à celles que l'on trouve dans les infections chroniques des animaux capturés dans la nature (fig. 2, 3). Le parasite se trouve alors entouré par une coque perméable au colorant, l'une de ses extrémités repliée à l'intérieur de l'enveloppe. L'ensemble mesure en moyenne  $14 \mu \times 3 \mu$ . Le noyau se trouve généralement situé plus près d'une extrémité que de l'autre. Sa forme est variable. Le plus souvent il occupe toute la largeur du parasite et sa chromatine est en fins rubans transversaux, rapprochés. Parfois il est allongé le long d'un bord ou bien relie obliquement un bord à l'autre; il est alors compact et homogène. Le cytoplasme granuleux contient de petites vacuoles et quelques grains azurophiles. Il n'y a pas de dimorphisme sexuel.

## 2) Sporogonie

Nous la décrivons chez *Culex pipiens fatigans* et *Anopheles stephensi*. La morphologie des stades sporogoniques est apparemment identique chez les deux vecteurs, à l'exception de la taille des oocystes mûrs, plus élevée chez *Culex*.

### a) Conjugaison et fécondation

Dans l'estomac du Moustique les gamétocytes deviennent rapidement extra-cellulaires. Leur coque se fend sur toute sa longueur et se dédouble en deux valves allongées que l'on retrouve fréquemment isolées, ou réunies, dans le contenu stomacal (fig. 2, 5). La longueur moyenne d'un gamétocyte libre sur frottis séché rapidement à l'air, fixé par l'alcool méthylique et coloré par le Giemsa est de  $19 \mu$ . Le noyau est médian, arrondi et compact. Les sexes ne sont pas encore différenciés (fig. 2, 4).

Les gamétocytes traversent rapidement la paroi digestive du Moustique, car on les retrouve dans l'hémocoel 6 heures après la piqûre.

L'accouplement qui a lieu dans la cavité générale, s'effectue tantôt à l'intérieur d'une cellule du corps gras, tantôt librement dans l'hémocoel. Les images de conjugaison et de fécondation peuvent être ob-

à partir d'une cellule fille du gamétocyte mâle; 15 microgamète libre; 16 fécondation; en haut, le noyau d'un gamète mâle pénètre dans le pronucleus femelle; à droite et en bas un deuxième microgamète; à droite et en haut, corps résiduel;

17 image rare avec 6 noyaux d'éléments mâles accolés à un macrogamète;

18 sporozoïtes sur frottis colorés

servées de la 12<sup>ème</sup> heure au 4<sup>ème</sup> jour, les premiers oocystes apparaissent dès le 2<sup>ème</sup> jour.

Deux gamétocytes apparemment identiques s'accolent sur toute leur longueur. Le macrogamétocyte commence le premier son évolution (fig. 2, 6): la masse cytoplasmique et le noyau augmentent de volume; la chromatine nucléaire forme des grains irréguliers dispersés dans un nucléoplasme uniformément rose; le cytoplasme est très chromophile. Le microgamétocyte grossit alors à son tour (fig. 2, 7 et 8); son noyau augmente de volume et reste très dense alors que le cytoplasme, clair, se vacuolise. L'ensemble gamète femelle et microgamétocyte est alors arrondi ou ovalaire, la surface de contact entre les deux étant plane, leur face externe bombée. Il est entouré par une fine membrane qui est fragile car les deux éléments sont souvent dissociés lors de l'étalement du corps gras du Moustique et retrouvés séparément dans les frottis. Nous n'avons pas observé d'images comparables à celles décrites par Mackerras (1962) où le gamétocyte femelle entoure le mâle qui est ainsi contenu dans une gouttière.

Au stade suivant, le noyau du gamétocyte mâle se divise en deux noyaux qui migrent chacun à un pôle (fig. 2, 9 et 10). Une cloison cytoplasmique apparaît alors, isolant deux cellules uninucléées (fig. 2, 11 et 12)<sup>2</sup>. Dans chacune d'elles, le noyau se divise à son tour et elles donnent naissance à deux gamètes mâles bi-flagellés et un corps résiduel (fig. 2, 14).

Le microgamète a une forme en virgule (fig. 2, 13 et 15); il semble constitué presque exclusivement par une chromatine dense et homogène. Le cytoplasme, très réduit, n'est décelable qu'au niveau de l'extrémité renflée du gamète. Celui-ci paraît traversé par une rainure longitudinale, aspect probablement provoqué par l'accolement de l'un des flagelles au corps du gamète. Les flagelles, très longs (25  $\mu$ ) semblent se détacher de l'extrémité effilée. Dans les frottis de corps gras de nombreux gamètes sont libres; d'autres sont encore rattachés par leur partie renflée au corps résiduel (fig. 2, 13 et 14). Ce dernier est une masse arrondie contenant des restes nucléaires sous forme d'une tache rose diffuse; son cytoplasme se colore en bleu pâle et contient quelques vacuoles et des grains azurophiles.

Quelques images de fécondation avec pénétration du gamète mâle dans le pronucléus femelle ont été observées (fig. 2, 16). Le gamète mâle fécondant se présente d'abord à un pôle du gamète femelle dont

---

<sup>2</sup> Nous avons, parfois, observé, accolée à un gamète femelle, une masse cytoplasmique aux limites imprécises contenant 4 et même 6 noyaux (fig. 2, 17). Il s'agit là soit de plusieurs gamétocytes mâles évoluant au contact d'un gamète femelle, soit de divisions nucléaires du gamétocyte mâle non accompagnées d'une fragmentation cytoplasmique.

le noyau émet un prolongement en sa direction, puis il pénètre à ce niveau dans le pronucléus femelle; on observe parfois autour du jeune oocyste, plusieurs gamètes mâles et un résidu cytoplasmique du microgamétocyte.

#### b) Evolution de l'oocyste

Le développement des oocystes jusqu'à leur maturation est très comparable à celui d'*Hepatozoon breintlii* tel qu'il a été décrit par Mackerras en 1962. On peut les observer dans toute la cavité générale du Moustique mais ils siègent le plus fréquemment dans l'abdomen.

Le très jeune oocyste, peu après sa fécondation, a un noyau de grande taille (il occupe presque la totalité du volume de la cellule) constitué par des granules de chromatine ronds ou allongés dispersés sur un fond uniformément rose. Le cytoplasme forme une bande étroite très basophile, limitée à l'extérieur par une fine membrane. L'oocyste grossit. Un nucléole apparaît au centre du noyau dont il occupe près de la moitié de la surface; la chromatine est, à ce stade, peu dense et homogène. Elle devient ensuite filamenteuse et la première mitose a lieu, suivie par plusieurs autres divisions nucléaires. Les noyaux se disposent à la périphérie de la masse cytoplasmique qui se décolle de la membrane du parasite.

Le cytoplasme bourgeonne au niveau de chaque noyau donnant à l'ensemble, lorsque le nombre de noyaux est élevé, un aspect muriforme. Puis, chaque saillie cytoplasmique s'individualise et forme un sporoblaste entouré d'une membrane. Les noyaux des sporoblastes se divisent activement, de nombreux globules de réserves apparaissent dans le cytoplasme qui se découpe à son tour pour donner naissance à des sporozoïtes et à un corps résiduel.

Le sporocyste ainsi formé peut présenter deux aspects: il est tantôt rond et contient des sporozoïtes disposés à la manière d'une corolle à demi fermée autour du corps résiduel; ailleurs le sporocyste est allongé et les sporozoïtes sont disposés parallèlement en deux groupes de part et d'autre du corps résiduel. Les deux types peuvent coexister dans le même oocyste. Le nombre de sporozoïtes dans un sporocyste est très variable (de 8 à 40).

Lorsque l'on fait éclater des oocystes et des sporocystes entre lame et lamelle dans du sérum physiologique, les sporozoïtes sont libérés: à frais ils mesurent  $19\ \mu$  de long en moyenne; après séchage de la préparation à l'air, fixation et coloration (fig. 2, 18) ils ont une forme de banane avec un noyau médian ou sub-médian et une chromatine en gros grains. Un globule de réserve ou cristalloïde, analogue à celui qui a été décrit dans les sporozoïtes d'autres Coccidiomorphes (Vetterling

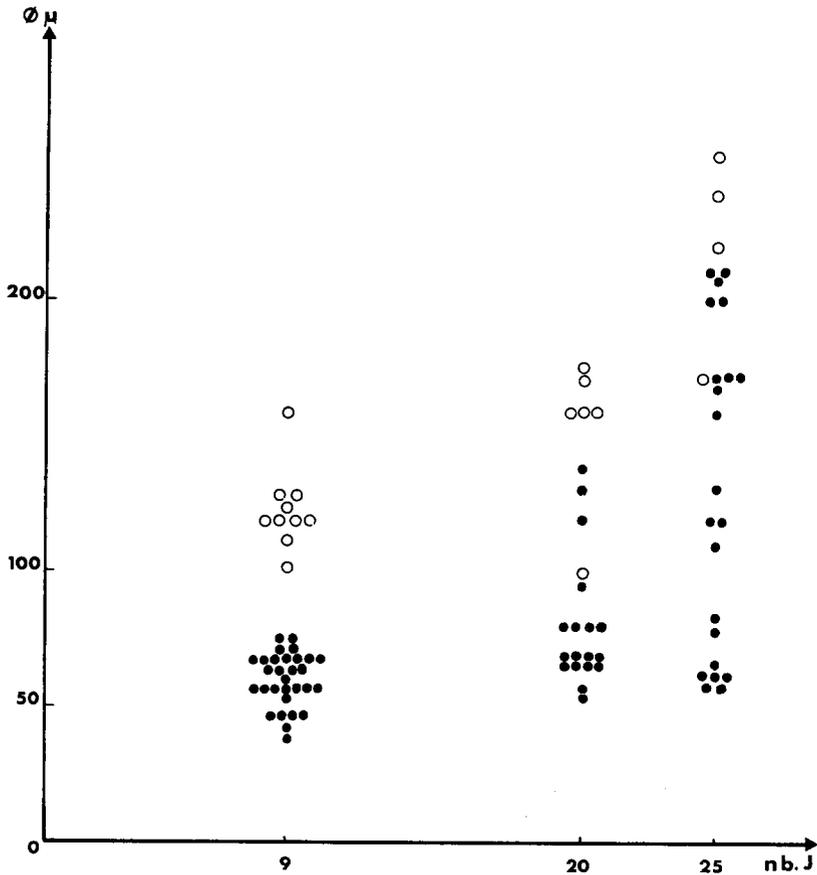


Fig. 3. Répartition des oocystes les 9, 20 et 25ème jours selon leur taille: (diamètre en  $\mu$ ); oocystes mûrs: points, oocystes immatures: cercles. Le manque de proportionalité apparente entre le pourcentage de petits oocystes à 9 jours à 20 jours et à 25 jours est simplement dû au fait que dans les infections tardives les oocystes mûrs se rompent très facilement lors de la dissection des Moustiques et ne peuvent plus être mesurés

et Doran, 1969; Desser, 1970), est accolé au noyau; il est parfois double, situé de part et d'autre du noyau.

Nous avons, comme Mackerras chez *H. breinlii*, observé de grandes variations dans la taille des oocystes mûrs d'*Hepatozoon domerguei*. En effet, certains oocystes mûrissent rapidement dès le 10ème jour à 25°, restent de petite taille (40 à 80  $\mu$ ) et contiennent un nombre réduit de sporocystes (4 à 16). D'autres mûrissent beaucoup plus lentement (20 à

25 jours) atteignent des tailles élevées (260  $\mu$ ) et leurs sporocystes sont très nombreux. Si on construit un histogramme des populations d'ocystes (fig. 3) les 10ème, 15ème et 25ème jours, on s'aperçoit qu'il existe deux populations correspondant aux deux types morphologiques décrits plus haut.

Les sporocystes et sporozoïtes paraissant morphologiquement identiques dans les deux populations, nous avons tenté d'infecter deux groupes d'animaux: les uns précocement, avec des Moustiques n'ayant que des ocystes de type petit, les autres tardivement avec des vecteurs contenant les deux types d'ocystes. 2 *Python sebae* ont avalé chacun 10 *A. stephensi* infectés depuis 16 jours et contenant des ocystes mûrs dont la taille moyenne était de 87,5  $\mu$  (56 à 112  $\mu$ ). Le premier, (469 LL) a été sacrifié à 25 jours alors que les gamétocytes apparaissaient dans le sang. Des schizontes étaient présents dans les tissus mais aucun kyste n'a été trouvé. Le second *Python* (484 LL) a été autopsié à 56 jours. Il était parasité par de nombreux schizontes tissulaires et gamétocytes sanguins, mais là encore, ses organes ne contenaient pas de kystes. Des fragments de foie et de poumon ont été ingérés par un *Oplurus sebae* (486 LL) qui n'a pas fait d'infection à *H. domerguei*. Cet animal était malheureusement parasité par une Hémogregarine différente d'*H. domerguei*. Nous considérons cependant que l'expérience est significative car d'une part des Anophèles gorgés sur l'Oplure ne se sont pas infectés, d'autre part nous n'avons eu aucun autre échec au cours des inoculations par ingestions d'organes (9 inoculations réussies sur 9 tentatives).

Dans l'ensemble de ces expériences, beaucoup d'animaux ont été infectés avec des Moustiques gorgés depuis 21 jours ou plus c'est-à-dire ayant les deux types d'ocyste. Sur 19 Reptiles réceptifs, 17 ont présenté des schizontes et des kystes dans leurs tissus. Les deux animaux négatifs n'avaient reçu qu'un seul Moustique chacun et leurs organes n'ont pas été ingérés, pour contrôle, par d'autres Reptiles. Par contre, le nombre d'animaux contaminés avec des Moustiques gorgés depuis 16 jours, c'est-à-dire uniquement avec des ocystes petits est trop faible pour permettre de déterminer avec certitude le rôle de ces formes. Cependant il existe de fortes présomptions pour que les ocystes petits ne soient pas à l'origine des kystes.

### 3) Formes tissulaires

Les premiers stades tissulaires ont été étudiés chez des Lézards de petite taille soumis à de fortes infections par ingestion de nombreux Moustiques très parasités: *Oplurus sebae* 483 LL a subi des biopsies hépatiques le 5ème, 7ème, 8ème, 9ème jours et a été autopsié le 10ème jour après l'ingestion de 100 *A. stephensi*. Pendant l'expérience il est resté à une température de 22° environ; 10 *Lacerta muralis* ont avalé

chacun 3 *A. stephensi* et ont été sacrifiés les 6ème, 8ème, 10ème, 12ème, 14ème, 18ème, 23ème, 30ème et 56ème jours. La température n'a pas été relevée de façon précise pour ces animaux mais elle était plus basse que pour l'Oplure, aux alentours de 18—20°.

Les stades plus tardifs sont décrits chez des Serpents et des Lézards sacrifiés entre le moment où sont apparus les premiers gamétocytes sanguins (environ 23 jours pour Pythons et Oplures, 40 jours pour les Serpents malgaches) et le 12ème mois de leur parasitémie.

#### ALLURE GÉNÉRALE DE L'INFECTION

Les sporozoïtes d'*H. domerguei* envahissent de façon préférentielle le foie où ils donnent naissance à deux types de formations:

1) Les unes sont des schizontes qui se divisent activement, se rompent et donnent naissance à d'autres schizontes et aux gamétocytes.

La schizogonie d'*H. domerguei* est remarquable par son asynchronisme, manifeste dès la première génération. Il nous a donc été impossible de déterminer le nombre de générations tissulaires qui précèdent l'apparition des gamétocytes. Celle-ci coïncide cependant avec l'envahissement de presque tous les tissus de l'hôte par des schizontes que leur morphologie permet de différencier de ceux qui sont apparus dans le foie au début de l'infection. Nous appelons donc schizontes primaires ceux qui sont issus directement des sporozoïtes et ceux qui leur ressemblent. Leur nombre, élevé au cours du premier mois de l'infection, décroît ensuite et ils deviennent très rares après le deuxième mois.

Les schizontes d'apparition plus tardive et qui produisent les gamétocytes seront appelés schizontes secondaires. Ils correspondent aux microschizontes ou schizontes x des auteurs tels que Mackerras (1962) et Ball et coll. (1969). La schizogonie secondaire persiste beaucoup plus longtemps que la schizogonie primaire car nous l'avons rencontrée dans des infections évoluant depuis plus d'un an.

2) Les autres sont des kystes contenant un nombre relativement faible d'éléments qui se forment par un processus d'endogénèse. Ils restent à l'état latent dans les tissus.

#### MORPHOLOGIE ET ÉVOLUTION DE LA SCHIZOGONIE

##### *A. Schizontes primaires*

###### a) Chez l'Oplure

Le 5ème jour, les sporozoïtes ont pénétré dans une cellule réticulo-endothéliale ou parenchymateuse du foie.

Leur taille est variable mais leur aspect uniforme (fig. 4, 1): ils sont ovalaires et le plus souvent déjà entourés par une membrane nette. Le noyau, généralement unique, est grand et fréquemment diffus; le cyto-

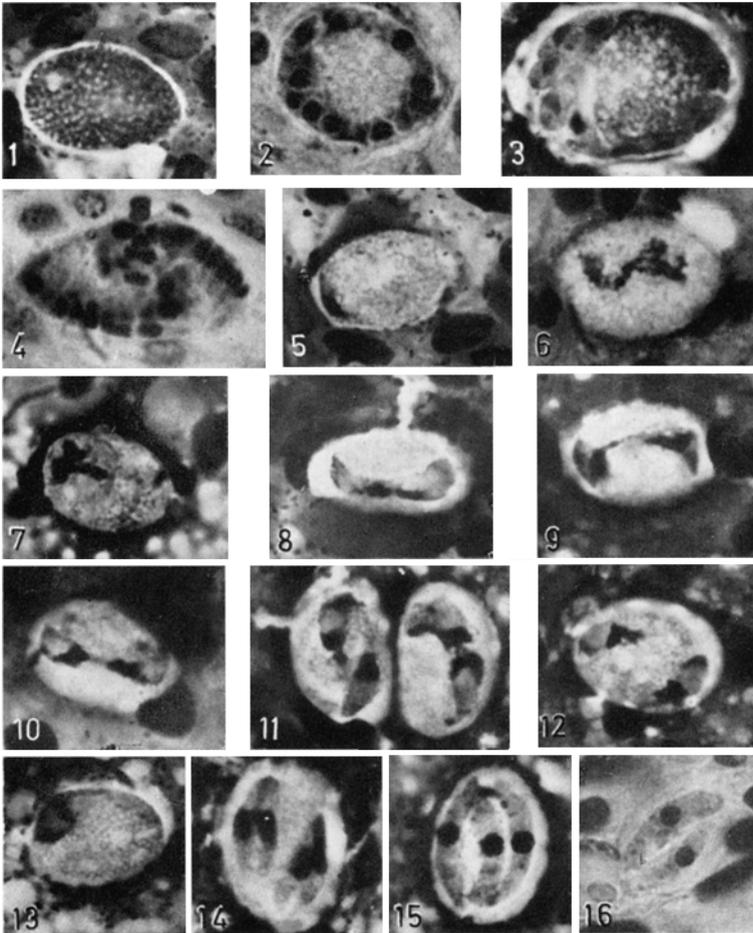


Fig. 4. Schizontes et kystes: 1 schizonte primaire uninucléé dans le foie; 2, 3 schizontes primaires avec perlage du cytoplasme et des noyaux à la périphérie; 4 schizonte secondaire mûr; 5 kyste uninucléé, contemporain de 1-; 6, 7 début de division du noyau d'un kyste; 8, 9, 10, 11 formation de deux endocytes avec division en deux du noyau, cristalloïde accolé à chaque noyau, apparition de la membrane de l'endocyte qui coiffe le pôle contenant le cristalloïde; 12 deux endocytes en cours de formation: la membrane n'est pas encore complète du côté opposé à celui du cristalloïde; 13 formation d'un seul endocyte: le cristalloïde et une partie de la membrane sont en place; 14 quatre endocytes baignant encore dans le cytoplasme de la cellule mère; 15, 16 kystes à deux mois: le cytoplasme de la cellule mère a disparu. (×960). 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15: frottis par apposition de foie; 2, 16: coupes de foie

plasme, bleu foncé, est parsemé de nombreuses petites vacuoles rondes qui lui donnent un aspect spongieux. Le cristalloïde est bien visible, simple ou divisé en deux.

Le 7ème jour, les parasites ont commencé à se diviser et l'on différencie déjà nettement les schizontes des kystes. Le développement des schizontes est asynchrone. Tous sont immatures. Sur coupes, certains contiennent 5 à 6 noyaux de grande taille (4—5  $\mu$ ) denses, disposés le long de la membrane du parasite; le cytoplasme est bleu et homogène. D'autres sont plus évolués, leurs noyaux ronds sont plus nombreux et plus petits (1,3  $\mu$ ) que les précédents. La chromatine est en grains à distribution régulière. On note déjà à la périphérie de certains d'entre eux la formation de bourgeons cytoplasmiques (fig. 4, 2 et 3) englobant un noyau; ils correspondent aux futurs schizozoïtes.

Dès le 8ème jour, les premiers schizontes mûrs sont formés, contenant une trentaine de schizozoïtes relativement grands, allongés avec fréquemment un petit cristalloïde dans leur cytoplasme. De nombreuses formes sont encore immatures à cette date.

Chez l'Oplure suivi jusqu'au 16ème jour, tous les schizontes correspondent à ce type morphologique.

#### b) Chez *Lacerta muralis*

Le développement diffère de celui décrit chez *Oplurus sebae*. Les schizontes sont peu nombreux; des formes mûres n'ont été observées que le 12ème et le 23ème jour. Le 56ème jour, les schizontes sont absents bien que les kystes soient nombreux. Enfin la gamétocytémie n'est pas apparue chez ces animaux. Il s'agit là probablement d'hôtes peu réceptifs aux formes schizogoniques et gamogoniques du parasite.

#### c) Chez les Serpents

Examinés précocement, les viscères ont été négatifs. En raison de leur plus grande taille, l'examen des premières générations nécessite des contaminations massives. La plupart des Serpents ont donc été autopsiés après l'apparition de la gamétocytémie. De rares schizontes primaires ont été observés au cours du deuxième mois de l'infection; ils semblent avoir disparu dans les infections plus anciennes.

### B. *Schizontes secondaires*

L'apparition des gamétocytes dans le sang des Reptiles coïncide avec l'envahissement de tout l'organisme par des schizontes différents des formes décrites précédemment. Ces schizontes occupent généralement les cellules endothéliales des parois vasculaires, surtout des sinusoides, mais également celles de plus gros vaisseaux. On les retrouve parfois libres

dans leur lumière. Ils se développent au niveau de tous les tissus mais avec une prédilection marquée pour le poumon.

Les formes immatures sont comparables à celles déjà décrites pour les stades antérieurs.

A maturité (fig. 4, 4), les schizontes ont une forme ovale et mesurent en coupe  $24\mu \times 17\mu$  de moyenne. Ils contiennent un nombre élevé de petits mérozoïtes (plus de 100) disposés de façon très caractéristique, en palissade. Les noyaux sont allongés, serrés les uns contre les autres, formant des faisceaux parallèles. En raison du nombre élevé de mérozoïtes, leurs limites cellulaires sont difficiles à distinguer avant la rupture du schizonte. Le cytoplasme des mérozoïtes est granuleux, prend bien le colorant et ne contient pas de globule de réserve. Le cytoplasme résiduel du schizonte se colore faiblement. Des grains azurophiles sont parfois observés mais on ne peut préciser leur localisation exacte à l'intérieur ou à l'extérieur des mérozoïtes.

En conclusion, la schizogonie d'*H. domerguei* se caractérise essentiellement:

- 1) par son asynchronisme: celui-ci s'installe dès la première génération; seul le délai d'apparition des premiers gamétocytes paraît fixe pour un hôte vertébré donné;
- 2) par la dualité des formes schizogoniques qui sont: soit primaires et semblent produire exclusivement d'autres schizontes, soit secondaires et sont à l'origine des gamétocytes.

#### ÉTUDE MORPHOLOGIQUE DES KYSTES

Ils siègent dans les cellules réticuloendothéliales et parenchymateuses de tous les organes, mais surtout dans celles du foie.

Chez des animaux placés à des températures voisines de  $22^{\circ}$ , la division nucléaire et cytoplasmique a lieu entre le 7ème et le 12ème jour, aucune forme de division n'ayant été observée au delà de ce délai. De plus, le nombre d'endocytes dans les kystes ne semble pas augmenter après cette période de multiplication; ainsi, le nombre moyen d'endocytes contenus dans 20 kystes, dans le foie de *Lacerta muralis* est de 3 le 18ème jour, 3,4 le 23ème jour et 2,2 le 60ème jour.

En coupe histologique comme dans les frottis par apposition, les kystes peuvent être différenciés des schizontes précocement, dès le 5ème jour; ils ont tous deux la même forme ovale, un cytoplasme parsemé de petites vacuoles rondes et un noyau unique, mais le cytoplasme du kyste (fig. 4, 5) est moins dense et moins colorable, son noyau plus compact et sa membrane limitante plus épaisse.

Le noyau du parasite uninucléé est granuleux, compact, allongé le long d'un bord; le cristalloïde, simple ou double, siège dans le cytoplasme du kyste (fig. 5, 1).

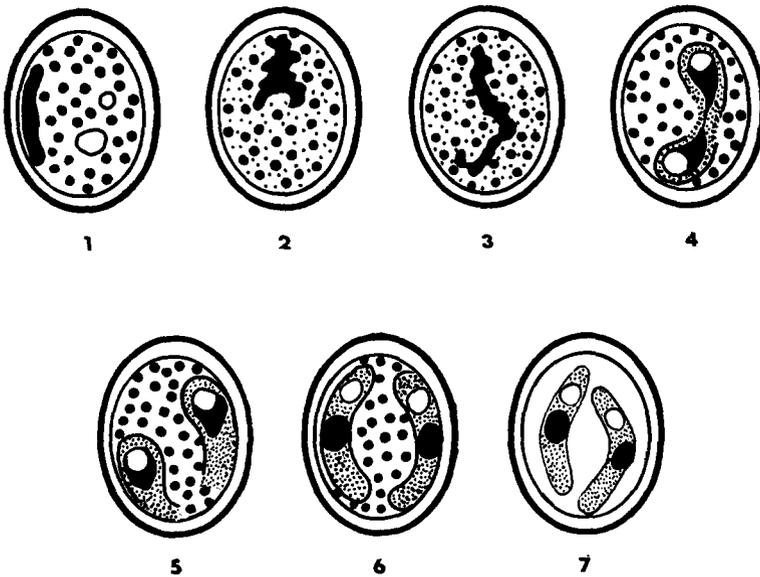


Fig. 5. Schéma de la formation de deux endocytes: 1 jeune kyste indivis au 5<sup>ème</sup> jour: cristalloïde visible, noyau compact et allongé; 2, 3 modifications nucléaires et cytoplasmiques précédant la division; 4 début d'individualisation des endocytes: fin de la division nucléaire — accolement du cristalloïde au noyau — apparition de la membrane à un pôle des futurs endocytes; 5 stade plus évolué de la formation des endocytes: séparation des futurs endocytes — extension de leur membrane cytoplasmique; 6 kyste à 15 jours: le cytoplasme de la cellule mère est encore présent, le cristalloïde s'est séparé du noyau; 7 kyste à 2 mois: le cytoplasme de la cellule mère a disparu

Nous décrivons ici, dans des frottis par apposition de foie, la division d'un kyste dans lequel se forment deux endocytes. Au moment de la division nucléaire, le cytoplasme du kyste devient opaque rendant l'observation du noyau difficile. Le cristalloïde n'est pas visible et il n'a pas été possible de déterminer s'il est masqué ou absent. Le noyau subit des transformations importantes (fig. 4, 6 et 7; fig. 5, 2 et 3): il devient irrégulier, le plus souvent allongé en position médiane dans le grand axe du kyste. La chromatine présente des zones de condensation et des zones diffuses avec des prolongements apparemment anarchiques. Au moment de la fragmentation de la chromatine pour former les noyaux fils trois phénomènes très nets sont apparus:

1) La chromatine est redevenue compacte et granuleuse, rassemblée dans les noyaux fils qui peuvent encore apparaître reliés par un fin pont chromatinien (fig. 4, 8 et 9; fig. 5, 4).

2) Un cristalloïde est accolé au pôle distal de chaque noyau fils dans lequel il creuse une dépression. Il peut même paraître contenu dans le noyau (fig. 4, 8 et 9; fig. 5, 4).

3) Avant même la séparation complète des noyaux, la membrane du futur endocyte apparaît incomplète, au niveau de l'extrémité contenant le cristalloïde (fig. 4, 8, 9, 10 et 11; fig. 5, 4).

Par la suite l'isolement des deux endocytes se poursuit à l'intérieur du cytoplasme de la cellule mère: le cytoplasme se condense localement pour former celui de l'endocyte tandis que la membrane apparue au niveau du pôle contenant le cristalloïde progresse vers l'extrémité opposée (fig. 4, 12; fig. 5, 5).

Lorsqu'un seul endocyte est formé (fig. 4, 13), son isolement est toujours précédé par l'accolement du cristalloïde à un pôle du noyau et sa membrane se constitue comme celle des formes décrites précédemment.

La formation simultanée de plusieurs endocytes a été observée: dans les images vues, les noyaux sont déjà divisés, disposés parallèlement et reliés par un pont de chromatine; les cristalloïdes siègent tous du même côté et la membrane de chaque élément est partiellement formée au niveau de l'extrémité contenant le cristalloïde.

L'endocyte ainsi formé est un vermicule allongé (fig. 4, 14; fig. 5, 6), mesurant sur frottis et lorsqu'il est à l'intérieur du kyste 20  $\mu$ . Le noyau médian est compact et arrondi, le cristalloïde ne leur est plus accolé, mais siège dans le cytoplasme de l'endocyte. Il baigne dans le cytoplasme de la cellule mère (fig. 4, 14; fig. 5, 6).

Il est infectant dès sa formation car nous avons observé des formes tissulaires d'*Hepatozoon domerguei* chez un *Lacerta sicula* ayant ingéré du foie d'un *L. muralis* contaminé depuis 9 jours.

Le cytoplasme de la cellule mère disparaît progressivement et n'est plus visible au-delà du 15<sup>ème</sup> jour (fig. 4, 15 et 16; fig. 5, 7). Il en est de même du cristalloïde absent des infections durant depuis un à deux mois. Après ce délai la morphologie du kyste est identique chez tous les animaux et à tous les stades de l'infection: C'est une formation ovale, mesurant sur frottis de 20  $\times$  11  $\mu$  à 25  $\times$  18  $\mu$  et sur coupes de 21  $\times$  12  $\mu$  à 23  $\times$  12  $\mu$ , entouré par une capsule solide. Les endocytes qu'il contient sont apparemment libres à l'intérieur de l'enveloppe. Leur nombre est variable: de 1 à 6 en général chez l'Oplure et les Serpents où il peut cependant atteindre parfois 12; 1 à 4 chez les Lacertidae, où il est très rarement plus élevé.

### Discussion

L'ensemble de données nouvelles acquises récemment par l'étude de quelques Coccidies comme *Toxoplasma*, *Hepatozoon*, *Klossiella* permet

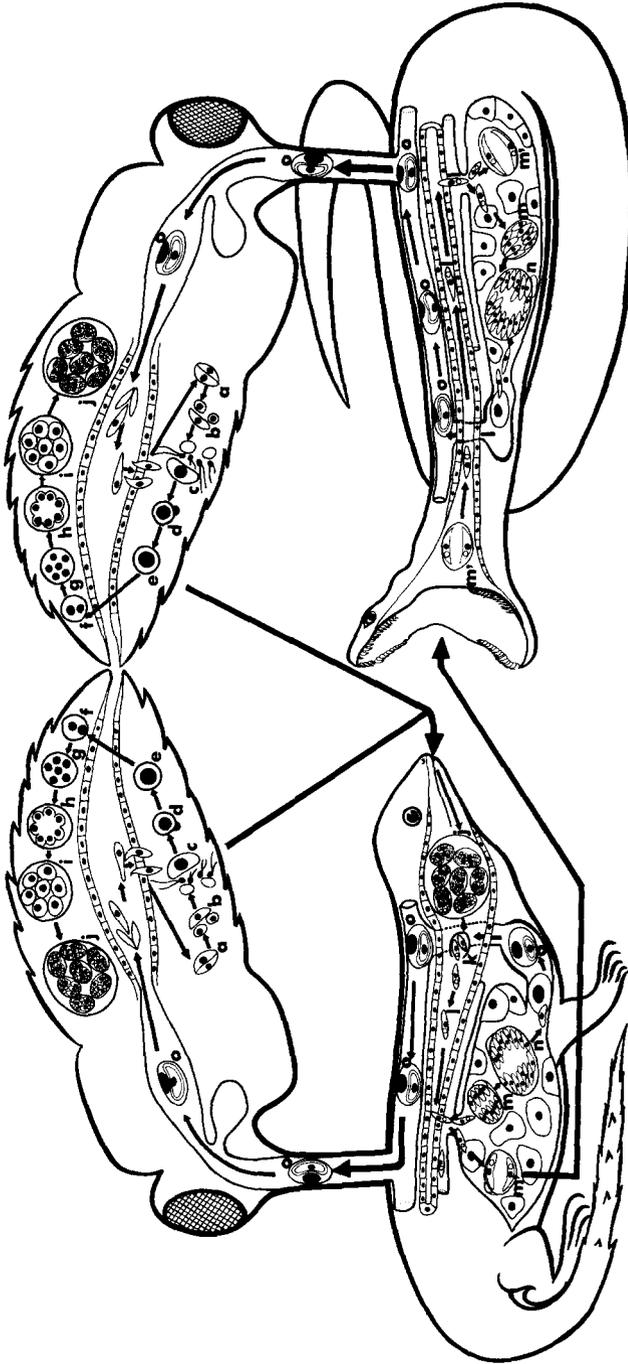


Fig. 6. Cycle biologique d'*Hepatozoon domerguei*: le Moustique s'infecte en piquant indifféremment le Léopard ou le Serpent, le Léopard en avalant le Moustique et ses kystes, le Serpent en mangeant le Léopard et ses kystes; *a* conjugaison de deux gamétocytes; *b*, *c* formation des microgamètes; *d* fécondation; *e* oocyste uninucléé; *f*, *g*, *h*, *i* formation des sporoblastes; *j* oocyste mûr; *k* libération des sporozoïtes dans le tube digestif d'un Léopard; *l* sporozoïtes qui traversent la paroi digestive et atteignent le foie par voie sanguine; *m* schizonte primaire; *m'* kyste; *n* schizonte secondaire; *e* gamétocyte

de modifier certaines données classiques sur le cycle biologique de ce groupe de parasites chez l'hôte vertébré. En effet, la découverte d'un double mode de transmission, démontré chez *Toxoplasma* et *Hepatozoon*, probable chez *Klossiella*, explique de nombreux aspects épidémiologiques du parasitisme par les Coccidies et permet de formuler des hypothèses sur les caractères fondamentaux de leur cycle.

Nous discuterons successivement : 1) le cycle biologique des Coccidies de Vertébrés, tel qu'on peut le concevoir actuellement ; 2) certains problèmes posés par le cycle d'*Hepatozoon* ; 3) le rôle et l'importance des kystes chez les Coccidies.

### 1) Cycle biologique des Coccidies de Vertébrés

Nous avons représenté sur un schéma (fig. 7) un certain nombre de possibilités de contamination expérimentale d'hôtes vertébrés par *Hepatozoon domerguei*.

Ce type d'évolution existe chez d'autres genres tels que *Toxoplasma gondii* (Hutchinson et coll., 1971) et *Klossiella mabokensis* (Boulard et Landau, 1971) pour lesquels, comme chez *Hepatozoon*, deux cycles issus des sporozoïtes peuvent évoluer en même temps chez l'hôte vertébré :

a) l'un, rapide, comprend plusieurs générations schizogoniques tissulaires et aboutit à la formation des gamétocytes qui sera suivie par la

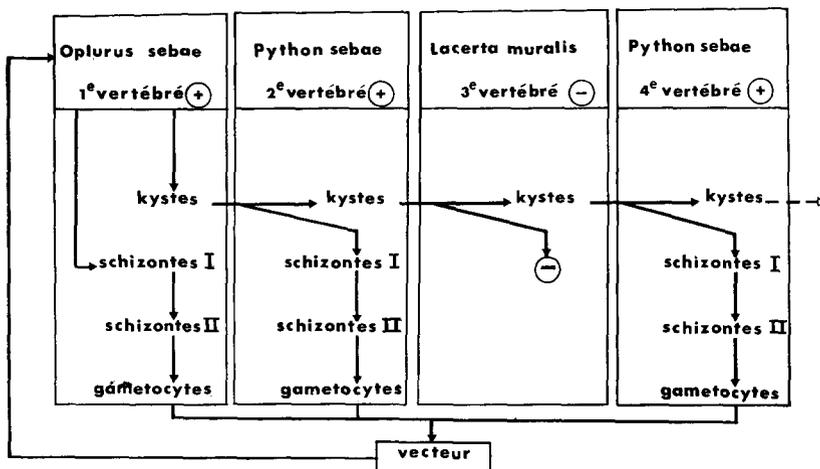


Fig. 7. Schéma des voies possibles de contamination de différents Reptiles par *H. domerguei*. + = Animal réceptif aux schizontes, gamétocytes et kystes. - = Animal réceptif aux seuls kystes. Schizontes I = schizontes primaires, Schizontes II = schizontes secondaires

sporogonie. Il permet la transmission du parasitisme par un vecteur hématophage ou par le milieu extérieur. C'est le type de cycle habituellement décrit chez la plupart des Coccidies;

b) l'autre, après une phase de division par endogenèse, produit des formes d'attente ou kystes dont l'évolution ne peut se poursuivre que chez un deuxième hôte vertébré, prédateur, qui les ingère. Le kyste assure la dissémination de l'infection dans la nature par deux mécanismes:

1. l'animal prédateur qui a ingéré des kystes, fait, s'il est réceptif, à la fois une infection de type a) et une infection de type b). Il devient ainsi infectant pour le vecteur par ses gamétocytes et pour d'autres prédateurs par ses kystes;

2. certains prédateurs, peu réceptifs au cycle de type a) peuvent néanmoins héberger des kystes dans leurs tissus et transmettre ainsi le parasite lorsqu'ils sont ingérés à leur tour.

## 2) Particularités du cycle d'*Hepatozoon*

### a) Origine des schizontes et des kystes

Nous avons tenté de résoudre, chez *Hepatozoon*, le problème de savoir à quel moment, au cours de l'évolution du parasitisme, se dissocient les deux cycles. Le sporozoïte qui a pénétré dans une cellule paraît déjà différencié lorsqu'il commence son évolution puisqu'il produit soit un schizonte, soit un kyste. Il ne semble pas, en effet, que le devenir du sporozoïte soit déterminé par le type de cellule dans laquelle il pénètre car, dans le foie des Reptiles, schizontes primaires et kystes se développent indifféremment dans des cellules réticulo-endothéliales ou parenchymateuses.

Les expériences préliminaires exposées ci-dessus semblent indiquer que dans le cas d'*Hepatozoon*, seuls les oocystes de grande taille permettent d'obtenir des kystes chez l'animal qui les ingère, mais nous ignorons encore le degré de spécialisation des oocystes.

### b) Asynchronisme des formes tissulaires

L'anarchie apparente du développement des premières générations tissulaires qui sont asynchrones est frappante. Elle contraste avec l'apparition à date relativement fixe des gamétocytes et des premiers schizontes secondaires, ces derniers évoluant également de façon asynchrone. Il n'est donc pas possible de connaître le nombre de générations ni la durée de la schizogonie primaire. Il est aussi difficile de déterminer l'origine des schizontes secondaires rencontrés dans les infections ancien-

nes datant de plusieurs mois. En effet, ceux-ci pourraient être issus de schizontes primaires à évolution retardée et non d'autres schizontes secondaires, comme on le pense généralement.

### 3) Rôle et importance des kystes

Le rôle des kystes est d'assurer la dissémination naturelle de l'infection par un mécanisme différent de celui des oocystes, en particulier chez des hôtes pour lesquels l'ingestion d'oocystes dans les conditions naturelles est improbable. Ce rôle est très important dans le cas de *Toxoplasma* et d'*Hepatozoon* dont les cycles peuvent se dérouler chez des animaux prédateurs. Chez *Hepatozoon* dont les oocystes se forment chez un Arthropode et ne sont pas excrétés dans le milieu extérieur, c'est le seul mode de transmission aux animaux non insectivores. Chez *Klossiella*, essentiellement parasite d'animaux non prédateurs, les kystes auraient un rôle moins important et représenteraient un reliquat peu fonctionnel d'un cycle plus primitif. Enfin, chez les Coccidies pour lesquelles la prédation n'intervient pas dans le cycle, en particulier les Coccidies très spécifiques et monoxènes, les kystes pourraient avoir complètement disparu.

La prolifération de formes végétatives (pseudokystes) devrait à notre avis être considérée comme une anomalie de l'endogénèse, apparaissant chez des souches hypervirulentes et dans des conditions particulières.

Travail effectué grâce à une subvention de l'Organisation Mondiale de la Santé.

### Bibliographie

- Ball, H. G., Jowett, C., Telford, S. R., Jr.: *Hepatozoon fusifex* sp. n., a Haemogregarine from *Boa constrictor* producing marked morphological changes in infected erythrocytes. *J. Parasit.* **55**, 800—813 (1969).
- Boulard, Y., Landau, I.: Note préliminaire sur la description et le cycle biologique de *Klossiella mabokensis* n. sp., *Adeleidea*, parasite de Muridés africains. *C.R. Acad. Sci. (Paris) Sér. D*, **273**, 2271—2274 (1971).
- Desser, S. S.: The fine structure of *Leucocytozoon simondi*. III. The ookinete and mature sporozoite. *Canad. J. Zool.* **48**, 641—645 (1970).
- Hutchinson, W. M., Dunachie, J. F., Work, K., Siim, J. Chr.: The life cycle of the coccidian parasite *Toxoplasma gondii*, in the domestic cat. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.* **65**, 380—398 (1971).
- Lainson, R.: Observations on the development and nature of pseudocysts and cysts of *Toxoplasma gondii*. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.* **52**, 396 (1958).
- Landau, I., Chabaud, A. G., Michel, J. C., Brygoo, E. R.: Mise en évidence d'un double mode de transmission chez un *Hepatozoon* de Reptiles malgaches. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* **270**, 2308—2310 (1970a).

- Landau, I., Chabaud, A. G., Michel, J.-C., Brygoo, E. R.: Données nouvelles sur le cycle évolutif d'*Hepatozoon domerguei*; importance de l'endogenèse; analogies avec d'autres cycles de Coccidies. C.R. Acad. Sci. (Paris) **271**, 1679—1681 (1970b).
- Mackerras, M. J.: The life history of a *Hepatozoon* (Sporozoa: Adeleidea) of varanid lizards in Australia. Aust. J. Zool. **10**, 35—44 (1962).
- Vetterling, J. M., Doran, D. J.: Storage polysaccharide in coccidial sporozoites after excystation and penetration of cells. J. Protozool. **16**, 772—775 (1969).

Prof. Dr. A. Chabaud  
Muséum National d'Histoire Naturelle  
Laboratoire de Zoologie (Vers)  
57, Rue Cuvier  
F-75 Paris V/France