Hepatocystis de Malaisie.

II. - Description d'*Hepatocystis brayi* n. sp., parasite de Sciuridae (1)

par F. MILTGEN *, Irène LANDAU *, Odile LE BAIL * et L.-Y. YAP **

* Laboratoire de Zoologie (Vers), associé au C.N.R.S.,
Muséum national d'Histoire naturelle, 43, rue Cuvier, F 75231 Paris Cedex 05

** Department of Medical Ecology, Institute for Medical Research,
Jalan Pahang, Kuala-Lumpur, Malaisie

Résumé.

Hepatocystis brayi n. sp. est décrit et séparé de la deuxième espèce parasite des Sciuridae de Malaisie, *H. malayensis* Field et Edeson, 1950.

Il s'agit d'une espèce très particulière, puisque toute son évolution tissulaire se fait à l'intérieur de la cellule hôte, dont le noyau et le cytoplasme sont très hypertrophiés. De plus, le peu d'abondance de la substance colloïde dans les mérocytes est un caractère exceptionnel dans le genre.

Enfin, *H. brayi* est un parasite d'hôtes fréquentant les étages moyen et inférieur de la canopée, *H. malayensis* les étages supérieur et moyen.

Summary.

Hepatocystis of Malaysia. II. — Description of *Hepatocystis brayi* n. sp. parasite of Sciuridae.

Hepatocystis brayi n. sp. is described and separated from the second species parasitising Malaysian Sciuridae, *H. malayensis* Field and Edeson, 1950.

H. brayi is characterized by: 1) the evolution of its tissue schizonts which are intracellular throughout all their development; the cytoplasm and the nucleus of the host cell are highly hypertrophied; 2) the scarcity of the colloid.

The schizogony persists for several months in the liver of infected animals and the gametocytaemia apparently undergoes seasonal relapses.

H. brayi is a parasite of hosts occurring in the middle and under canopy, *H. malayensis* the middle and top canopy.

(1) Dans un article précédent, Landau et coll. (1976) ont montré qu'en Malaisie péninsulaire, les Sciuridés sont souvent parasités par deux espèces d'*Hepatocystis*: *H. malayensis* et une seconde espèce décrite ici, que nous nommons *Hepatocystis brayi* n. sp., en hommage à R. S. Bray,

Le matériel que nous avons utilisé pour cette étude est consigné dans le *tableau I* de l'article précédent ; en résumé :

— sur 29 *Callosciurus notatus* examinés, 18 étaient parasités, et ne l'étaient que par *H. brayi* ; — sur 20 *C. nigrovittatus*, 7 étaient parasités par *H. brayi* seul, 4 par *H. malayensis*, et 3 présentaient une infection mixte ; — tous les *C. caniceps* (3/3) étaient parasités par *H. brayi*, et un l'était également par *H. malayensis* ; — aucun des 4 *Sundasciurus tenuis* n'était parasité par *H. brayi* ; — un *Lariscus insignis* sur les deux examinés était porteur d'*H. brayi*.

Nous nous proposons, dans cet article, de : 1) étudier l'évolution de l'infection chez des animaux en captivité jusqu'à 20 mois ; 2) décrire *H. brayi* n. sp. dans le sang et les tissus d'Ecureuils naturellement infectés ; 3) discuter du statut taxonomique d'*H. brayi* ; 4) analyser la répartition des deux parasites, *H. malayensis* et *H. brayi*, chez les différents hôtes en fonction de leur habitat.

I. - Évolution de l'infection

La parasitémie de 7 Ecureuils (6 *C. notatus* et 1 *C. caniceps*), infectés par *H. brayi* uniquement, a été régulièrement suivie (*Tableau I*) durant plusieurs mois (5 au minimum et 17 au maximum).

TABLEAU I. — Evolution de la parasitémie de 7 *Callosciurus notatus* au cours des années 1974 et 1975.

A leur arrivée dans notre laboratoire, en mars 1974, tous ces Ecureuils présentaient soit uniquement des gamétocytes mûrs, soit des gamétocytes mûrs et des formes immatures.

Tous les Ecureuils ont présenté des alternances de phases négatives et positives plus ou moins longues, sauf un, dont la parasitémie a persisté sans interruption pendant plus de neuf mois, avec seulement des variations d'intensité. Entre le 15 juin et le 8 juillet 1974, nous avons noté l'apparition de formes jeunes chez les 6 Ecureuils restants. Les autres rechutes se sont produites sans rythme particulier, avec des intervalles négatifs de durée très variable, allant jusqu'à 5 mois.

D'autre part, des biopsies de foie effectuées chez ces Ecureuils, après plusieurs mois de captivité, ont permis de mettre en évidence des schizontes de tailles différentes : chez l'un des Ecureuils, biopsié 3 mois après la capture, nous avons trouvé un schizonte de petite taille, dont la morphologie est comparable à celle de la *figure II, 4*, ainsi que plusieurs schizontes à un stade plus avancé ; chez un autre Ecureuil, biopsié après 9 mois de captivité, pendant une phase de rechute sanguine, nous avons observé un schizonte comparable à celui de la *figure II, 1*.

La morphologie de tous ces schizontes, trouvés après plusieurs mois de captivité, est identique à celle des schizontes d'infections récentes.

L'évolution de la parasitémie, ainsi que la présence, dans une même biopsie, de schizontes à différents stades de maturation, semblent avoir pour origine deux phénomènes différents : l'apparition anarchique dans le temps de formes jeunes, durant les premiers mois suivant la capture, pourrait correspondre à la rupture des schizontes issus de sporozoïtes inoculés à des temps différents : l'apparition synchrone de formes jeunes chez les 6 Ecureuils, plus de trois mois après la capture, et celle de gamétocytes chez deux d'entre eux, un an plus tard, correspondraient à de vraies rechutes saisonnières.

II. - Description

1) Formes sanguines (*fig. I*).

Lorsque le mérozoïte est entré dans le globule rouge, son cytoplasme se développe en même temps que se creuse la vacuole ; il se présente alors comme un anneau très fin semblable aux formes jeunes de *Plasmodium*.

FIG. 1. — Schéma des gamétocytes d'*H. brayi* ; 1 : macrogamétocyte ; 2 : microgamétocyte.

Le cytoplasme est bleu pâle, homogène, et, à ce stade, ne contient pas encore de pigment ; le noyau, couleur rubis, est arrondi ou ovalaire, ou encore lobé en forme d'haltères ; il y a fréquemment polyparasitisme et on peut rencontrer jusqu'à 4 anneaux par hématie.

Le cytoplasme s'épaissit et devient plus colorable à mesure que le gamétocyte évolue, son aspect général est alors légèrement amiboïde, mais plus compact que celui d'*H. malayensis* ; on ne rencontre presque pas de formes en bande ; le noyau, à ce stade, est plus déchiqueté, très polymorphe. L'hématie elle-même ne présente pas d'altérations.

Quand le gamétocyte atteint une taille à peu près égale au tiers de celle de l'hématie, il commence à se charger d'un pigment brun foncé, le plus souvent granulaire. Puis, tout le globule est progressivement envahi par le cytoplasme parasitaire, qui est de plus en plus dense ; la vacuole commence à se résorber ; les grains de pigment deviennent plus nombreux et parfois s'agglomèrent en petits amas. Le globule rouge se réduit à une mince couronne cytoplasmique, puis disparaît.

On peut rencontrer différents stades dans un même globule, et il n'est pas exceptionnel d'observer un gamétocyte mâle et un gamétocyte femelle dans la même hématie.

— *Gamétocytes mûrs* - *Gamétocyte* ♂. (Taille moyenne : 7,6 μ).

Le cytoplasme des gamétocytes mâles est rose, avec parfois quelques petites plages grisâtres ; le noyau est arrondi, formé d'un centre rouge vif homogène, entouré d'une large couronne rose souvent plus intensément colorée que le cytoplasme. Ceci confère au microgamète un aspect en « cocarde » (Landau et coll. b).

Lorsque le noyau est périphérique, l'image est assez caractéristique : le gamétocyte présente un tiers fortement coloré (noyau) et l'autre plus pâle, où se trouve accumulé le pigment ; celui-ci est en général assez grossier, bacilliforme, de couleur brun clair.

— *Gamétocyte* ♀. (Taille moyenne : 6 μ).

Il est arrondi ou ovale, et compact ; son cytoplasme se colore en bleu clair. Le noyau est beaucoup plus petit que celui du gamétocyte mâle ; il est ovalaire, plus ou moins allongé, souvent fragmenté en petites masses de chromatine ; il se colore en rouge brique. Le pigment est réparti dans tout le cytoplasme ; il est fin, punctiforme, presque noir, plus foncé que chez le gamétocyte mâle.

2) Schizogonie.

Les schizontes effectuent leur développement dans les tissus hépatiques ; ils sont intra-cellulaires ; nous ne pouvons cependant affirmer s'ils se développent dans un hépatocyte ou dans les cellules du système réticulo-endothélial.

Le plus jeune schizonte observé (fig. II, 1) se développe dans une cellule déjà hypertrophiée, ovalaire, de 39 $\mu \times 28 \mu$. La cellule est limitée par une membrane épaisse (1,5 à 2,5 μ), dont la texture est finement granuleuse ; elle est colorée en rose vif ; le cytoplasme cellulaire est pâle, gris ou rose, adhérent à la membrane ; le noyau, également hypertrophié, grossièrement triangulaire, est repoussé à la périphérie par le schizonte en développement ; sa chromatine est répartie en grosses mottes arrondies

FIG. 2. — 1-2 : jeunes schizontes hépatiques ; 3 : détail d'un schizonte analogue à celui de la figure 4 (P = parasite ; N = noyau de la cellule hôte ; C = cytoplasme de la cellule hôte) ; 4 : schizonte immature.

FIG. 3. — 1: schizonte presque mûr; 2: schizonte lobé atypique, sans cellule hôte hypertrophiée; 3: schizonte mûr et rompu.

ou polygonales, d'environ 1 μ , et fortement colorées en bordeaux foncé, en disposition régulière.

Le schizonte proprement dit est une masse arrondie de 10 μ de diamètre, située à l'intérieur d'une vacuole ; il est entouré d'une membrane nette, légèrement détachée du cytoplasme cellulaire, qui s'est rétracté lors de la fixation ; son cytoplasme est dense, homogène, coloré en rose ; les noyaux parasitaires, rouge foncé, relativement peu nombreux, sont punctiformes ou en bâtonnets nettement séparés les uns des autres. Il existe autour de la cellule parasitée un léger infiltrat de cellules mononucléées d'allure lymphoblastique. Cet infiltrat est souvent polaire et peu étendu, en général en une ou deux couches cellulaires. Un tout petit schizonte a été trouvé entièrement entouré par une couronne de lymphoblastes (*fig. II, 1*).

La cellule parasitée augmente de taille à mesure que croît le schizonte, et persiste jusqu'à maturité. Le noyau de la cellule hôte, de plus en plus repoussé vers la périphérie, a en coupe, l'aspect d'un grand croissant tassé entre le schizonte et la membrane cellulaire ; il est polylobé et, lorsque plusieurs lobes sont intéressés sur la même coupe, il paraît fragmenté en deux ou trois morceaux. Le cytoplasme parasitaire perd le caractère compact qu'il avait dans les formes très jeunes ; il forme un réseau de mailles très lâches (*fig. II, 3-4*), peu coloré, parsemé de noyaux punctiformes de très petite taille, colorés en rouge vif. Lorsque le schizonte atteint une grande taille (de l'ordre de 800 à 1 200 μ) (*fig. III, 1*), la plupart du volume est occupée par le parasite autour duquel ne persiste qu'une couronne cytoplasmique de 2 à 30 μ d'épaisseur, englobant un noyau remarquablement hypertrophié, qui, en coupe, s'étire souvent sur plusieurs centaines de microns. La membrane cellulaire est très épaissie (jusqu'à 6 μ). Malgré cette hypertrophie considérable, le noyau conserve durant tout le développement du mérocyste une structure très régulière résultant d'une juxtaposition serrée de masses de chromatine polygonales ou arrondies dont la taille ne dépasse pas 2 μ . Cet aspect trompeur peut faire confondre le noyau de la cellule hôte avec le parasite.

Le parasite, entouré d'un fin liseré rose, est devenu très dense, fortement basophile, et contient une multitude de très petits noyaux groupés en amas, délimitant de petites vacuoles de 1 à 7 μ de diamètre. Ces petites vacuoles, plus nombreuses au centre du schizonte qu'en périphérie, sont remplies de substance colloïde faiblement colorée en rose ou en jaune pâle.

La maturation est synchrone et, à ce stade, le schizonte atteint la taille de 1.300 μ . Malgré le grand volume du parasite, le parenchyme hépatique adjacent n'est pas affecté ; seuls, les hépatocytes en contact direct avec le mérocyste sont légèrement tassés. Il n'y a pas, ou très peu, de réaction inflammatoire et elle est toujours monomorphe, de type lymphoblastique. Ce n'est que lors de la rupture du mérocyste qu'apparaîtra un granulome inflammatoire à polynucléaires, macrophages et cellules géantes.

Nous avons, d'autre part, dans quelques biopsies hépatiques, rencontré des schizontes de morphologie très particulière, que nous n'avons pu rattacher à un type de gamétocytes et que nous n'avons pu replacer dans l'évolution des formes tissulaires ni d'*H. malayensis*, ni d'*H. brayi*.

Ces schizontes sont très compacts, souvent polylobés, entourés d'une paroi épaisse. Leur développement est extra-cellulaire ; ils ne contiennent ni vacuole, ni substance colloïde. Leur taille peut atteindre $110\ \mu$ et, à ce stade, ils ne sont pas mûrs. Une illustration de ces schizontes est donnée sur la *figure III, 2*.

FIG. 4. — Schéma de l'évolution de la schizogonie d'*H. brayi* (L = lymphoblastes ; NC = noyau de la cellule hôte).

III. - Statut taxonomique

H. malayensis et *H. brayi* diffèrent par de nombreux caractères :

— *Gamétocytes* : les microgamétocytes d'*H. malayensis* sont de type « diffus », ceux d'*H. brayi* « en cocarde ». (Cf. Landau, Miltgen et Chabaud, 1976 b).

— Schizontes :

a) *H. malayensis* : les schizontes hépatiques jeunes siégeant dans la cellule hépatique sont de morphologie proche de celle des schizontes préérythrocytaires des *Plasmodium* de Mammifères ; disparition de la cellule hôte au cours de la croissance du parasite ; apparition d'une cavité intérieure excentrée, remplie d'une substance

« colloïde » délimitant deux zones dans le schizonte : l'une mince, l'autre épaisse, proliférative ; induction d'une réaction importante par les formes relativement âgées ; asynchronisme de maturation des constituants du schizonte attaqué par les macrophages.

b) *H. brayi* : ils se développent dans le foie et sont intracellulaires durant toute leur maturation, ce qui entraîne une hypertrophie considérable de la cellule hôte et de son noyau. Ils sont très monomorphes, ovulaires, ne présentant pas de digitations ; ils ne sont jamais creusés par une grosse vacuole et leur substance colloïde, extrêmement réduite, n'est visible qu'en fin de maturation sous forme de petits amas de quelques microns de diamètre. La réaction cellulaire avoisinante est nulle ou très faible ; si elle existe, elle est faite exclusivement de cellules mononucléaires d'aspect lymphoblastique.

Les rapports d'*H. brayi* avec le groupe *vassali* sont difficiles à préciser, du fait que le nom d'*H. vassali* a été donné à tous les *Hepatocystis* de Sciuiridae du Sud-Est asiatique. Or, dans plusieurs cas, celui de Taïwan en particulier, les Ecureuils paraissent parasités, comme en Malaisie, par deux espèces.

a) *H. vassali vassali*.

Hepatocystis brayi a des gamétocytes proches de ceux d'*H. vassali* (Laveran, 1905), espèce dont seules les formes sanguines sont connues. Van Peenen et coll. (1968) ont décrit au Vietnam des schizontes et des gamétocytes d'un *Hepatocystis* qu'ils pensent être *H. v. vassali*. Cependant, comme nous l'avons discuté dans un article précédent (Landau et coll., 1976), la correspondance des schizontes tissulaires trouvés par ces auteurs avec les gamétocytes décrits par Vassal ne nous paraît pas établie. Quoi qu'il en soit, le nom d'*H. vassali* est attaché à un type de gamétocytes proche d'*H. brayi*. En l'absence de renseignements précis sur la schizogonie d'*H. vassali vassali*, nous avons préféré donner un nom au parasite décrit ici. En effet, le type de gamétocyte d'*H. brayi* « en cocarde », est très commun et leur ressemblance ne permet pas de conclure à leur identité. Si toutefois les formes tissulaires d'*H. v. vassali* se révélaient très proches de celles d'*H. brayi*, ce dernier deviendrait sous-espèce ou synonyme d'*H. vassali*.

b) *H. vassali yokogawai* Wu, 1953.

Il ne nous paraît pas douteux qu'il existe à Taïwan 2 espèces d'*Hepatocystis*, décrites sous le même nom. Wu décrit en 1953 un parasite dont les schizontes sont de même type qu'*H. malayensis* et les gamétocytes seraient, selon cet auteur, identiques à ceux d'*H. vassali* (Laveran, 1905). Nous avons examiné des lames de collection de P. C. C. Garnham, qui lui ont été communiquées par Hsieh ; nous avons observé deux types de gamétocytes, l'un proche d'*H. malayensis*, l'autre d'*H. brayi*, et un schizonte proche d'*H. brayi*.

c) *H. v. ratufae* (Mulligan et Sommerville, 1947).

Les schizontes exo-érythrocytaires ne sont pas connus. Les gamétocytes figurés par Garnham, 1966, d'après un matériel personnel, sont de même type qu'*H. malayensis*.

Par ailleurs, *H. brayi* se différencie de toutes les autres espèces d'*Hepatocystis* connues, à l'exception d'*H. fieldi* Garnham et Edeson, 1962, par l'hypertrophie considérable de la cellule hôte et de son noyau, et le caractère réduit de sa colloïde.

Enfin, le noyau de la cellule hôte est latéral chez *H. brayi*, et central chez *H. fieldi*; en outre, le schizonte d'*H. brayi* forme une seule masse parasitaire, alors que celui d'*H. fieldi* est fragmenté.

IV. - Répartition des espèces en fonction de l'habitat des hôtes

L'infection mixte d'un même hôte par plusieurs *Hepatocystis* ne semble pas exceptionnelle. Ce problème avait déjà été soulevé par Dasgupta à propos de *Rayella rayi* et par Garnham à propos des *Hepatocystis* de Singes africains. Dans le cadre de notre étude, il est remarquable de noter que les *Callosciurus nigrovittatus* sont porteurs de deux espèces d'*Hepatocystis*, *H. brayi* et *H. malayensis*, alors que les *C. notatus* ne sont parasités que par une seule : *H. brayi*.

Tous les Ecureuils que nous avons examinés vivent dans la canopée. Cependant, l'espace vertical de la canopée occupé par les différentes espèces d'Ecureuils est variable; il est classique de diviser la canopée en trois étages : la canopée supérieure, une zone moyenne, et la sous-canopée.

Dans la sous-canopée, vit *Lariscus insignis*, Ecureuil qui n'est qu'exceptionnellement parasité par *Hepatocystis* (Dunn et coll., 1968).

Callosciurus notatus, qui vit dans la sous-canopée et dans la zone moyenne, n'est parasité que par *H. brayi*. Tandis que *C. nigrovittatus*, qui évolue dans la zone moyenne, mais aussi dans la canopée supérieure, est parasité par les deux espèces, *H. brayi* et *H. malayensis*. Il en est de même pour *C. caniceps*, qui évolue dans les trois étages de la forêt.

La répartition de ces espèces d'*Hepatocystis*, à spécificité peu étroite, semble donc déterminée uniquement par l'habitat des hôtes; leur transmission est donc vraisemblablement assurée par des vecteurs différents.

Ce phénomène de zonation verticale des parasites dans la canopée avait déjà été signalé par Quentin et Krishnasamy (1975), à propos des Oxyures parasites de Rongeurs Pétauristins en Malaisie.

Bibliographie

- DUNN (F. L.), LIM (B. L.) et YAP (L. F.), 1968. — Endoparasite patterns in Mammals of the Malayan rain forest. *Ecology*, 49, 1178-1184.
- GARNHAM (P. C. C.), 1966. — Malaria Parasites and other Haemosporidia. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford, 1 114 p.

- GARNHAM (P. C. C.) et EDESON (J. F. B.), 1962. — Two new malaria parasites of the Malayan mouse-deer. *Riv. Malar.*, 41, 3-10.
- LANDAU (I.), MILTGEN (F.), YAP (L.-F.) et LE BAIL (O.), 1976 (a). — *Hepatocystis* de Malaisie. I. Redescription d'*Hepatocystis malayensis* Field et Edeson, 1950, parasite de Sciuridae, 51, 000-000.
- LANDAU (I.), MILTGEN (F.) et CHABAUD (A.-G.), 1976 (b). — Les différents types de gamétocytes chez les Hémosporidies de Mammifères. Corrélations avec la morphologie des schizontes pré-érythrocytaires. Hypothèses sur l'évolution du groupe, 51, 000-000.
- QUENTIN (J.-C.) et KRISHNASAMY (M.), 1975. — Oxyures de Rongeurs. I. Spéciations des Oxyures parasites des Rongeurs Petauristins en Malaisie. *Mém. Mus. nat. Hist. nat.*, nouvelle série, Sér. A, Zool., 94, 1-50.
- VAN PEENEN (P. F. D.), HOOGSTRAAL (H.), DUNCAN (J. F.) et RYAN (P. F.), 1968. — Hematozoa from Mammals of South Vietnam. *The J. Protoz.*, 15, 608-613.
- WU (C. L.), 1953. — Contributions to the Study on the mammalian malaria in Formosa. *Acta Med. Fukuoka*, 23, 1979-1994.
-