

SUR LES TRYPANOSOMES D'OISEAUX ESTRILDIDAE

II — Études biologiques

J. CHANDENIER*, I. LANDAU**, D. BACCAM**

RÉSUMÉ. Une étude biologique des quatre Trypanosomes d'Estrildidae décrits dans un précédent travail (Chandenier et coll., 1988) est réalisée.

Chez *Culicoides nubeculosus*, le développement complet de ces parasites s'effectue en sept jours. L'apparition des formes trypomastigotes infestantes est précédée d'une intense phase de multiplication du parasite sous forme amastigote.

Les formes infestantes sont par ailleurs obtenues en treize jours en culture sur milieu NNN.

La transmission des Trypanosomes à des Oiseaux sains est tentée à plusieurs reprises. Dans deux cas sur huit essais, une parasitémie satisfaisante est obtenue et un nouveau passage est tenté. De façon étonnante, ces Trypanosomes nouvellement apparus se révèlent incapables de se développer, tant en culture que chez le Culicoïde.

L'absence d'un facteur indispensable à la maturation complète des parasites est l'hypothèse retenue pour tenter d'expliquer ce fait.

Mots-clés : Trypanosomes. Estrilda. Culicoïdes. Cultures. Transmission.

On the Trypanosomes of Estrildidae Birds. Part II. Studies on Biology.

SUMMARY. Studies on the biology of 4 Trypanosomes of Estrildidae birds described in a previous paper (Chandenier *et al.*, 1988) are related.

In *Culicoides nubeculosus*, the complete development is achieved in 7 days. After a phase of intense multiplication of amastigotes in the gut, infective trypomastigotes appear.

In cultures, infective stages are obtained in 13 days.

Transmission to clean birds was attempted: in two out of 8 attempts, a satisfactory level of parasitaemia is obtained. Surprisingly Trypanosomes infecting the new birds are unable to develop further in cultures or in Culicoides.

The most likely hypothesis is the lack of a factor allowing the Trypanosomes to mature.

Key-words : Trypanosomes. Estrilda. Culicoides. Cultures. Transmission.

* Laboratoire de Protozoologie et Parasitologie Comparée, École Pratique des Hautes Études 61, rue Buffon, F 75231 Paris Cedex 05, Service de Parasitologie-Médecine Tropicale, Hôpital de la Salpêtrière, F 75013 Paris.

** Laboratoire de Zoologie (Vers), associé au C. N. R. S., Muséum National d'Histoire Naturelle, 61, rue Buffon, F 75231 Paris Cedex 05.

Accepté le 27 janvier 1988.

Quatre espèces de Trypanosomes d'*Estrildidae* ont été décrites dans un précédent travail (Chandenier et coll., 1988).

Le développement de ces parasites en culture et chez le vecteur d'élevage *Culicoides nubeculosus* est étudié ici. Des tentatives de transmission sont par ailleurs effectuées à partir des formes infectantes ainsi obtenues.

Matériel et méthodes

Les vecteurs expérimentaux sont des *Culicoides nubeculosus* dont l'élevage est entretenu au Muséum. Ils sont conservés à 23-24° en atmosphère humide (75 % d'hygrométrie) et nourris par de l'eau sucrée.

Lors des gorgements, les Oiseaux sont immobilisés sur une cage de vecteur éclos depuis 2 à 3 jours. Seules les femelles gorgées sont ensuite conservées. Elles sont disséquées sous la loupe binoculaire après anesthésie à l'éther. L'estomac est examiné à frais puis transféré sur une nouvelle lame, dilacéré dans une très petite quantité de sérum physiologique et séché rapidement. Après fixation au méthanol, les étalements sont colorés au Giemsa à 10 %.

Les cultures sont réalisées en milieu NNN en tube dont la phase liquide est constituée d'un millilitre d'une solution de pénicilline (10 000 UI/ml)-streptomycine (10 mg/ml) (Gibco).

Après ponction d'une veine de l'aile, le sang est prélevé à l'aide d'une seringue et les tubes sont ensemencés et conservés à 24°.

Pour l'étude des stades de développement 0,1 ml de liquide est prélevé stérilement au fond du tube, à la jonction phase liquide-phase solide. Après centrifugation, le culot est lavé une fois dans 20 à 30 volumes d'Hépès et étalé sur une lame.

Toutes les préparations sont colorées au Giemsa à 10 % après fixation au méthanol.

Les dessins et mensurations sont réalisés à la chambre claire.

DÉVELOPPEMENT CHEZ *Culicoides nubeculosus*

Nous décrivons ici l'évolution, chez le Culicoïde, de *T. chabaudi* qui est l'espèce pour laquelle nous possédons le plus grand nombre de données.

Les dissections ont été effectuées de 30 minutes à 170 heures après le repas infestant :

— de 30 minutes à 2 heures après le gorgement, de rares Trypanosomes fusiformes, amastigotes sont trouvés. Leur taille est sensiblement égale à celle de la forme sanguine mais en raison de l'intense basophilie du cytoplasme, le noyau et le kinetoplaste sont peu visibles ;

— entre 7 et 13 heures, aucun parasite n'est trouvé ;

— à 20 heures, des éléments amastigotes isolés, arrondis, peu nombreux,

existent sur les préparations. Leur diamètre varie de 4 à 6 μm . Certains, plus gros (jusqu'à 8-9 μm) sont en division (*fig. 1 A*) ;

— à 24 heures, nous observons des amas en rosaces de parasites issus de divisions successives. Il s'agit d'éléments allongés, de 5 à 10 μm de long. Il existe chez certains d'entre eux une ébauche de flagelle qui semble tout entier contenu dans un canal intracytoplasmique (*fig. 1 B*) ;

— à 48 heures, d'exceptionnelles formes flagellées épi- ou trypomastigotes sont observées (*fig. 1 C1 et C2*) ;

— entre 70 et 150 heures, les parasites sont devenus très nombreux. Ce sont uniquement des amastigotes, tantôt isolés, tantôt groupés en amas ou en rosaces (*fig. 1 D*). Leur taille varie de 5 à 15 μm en augmentant progressivement avec le temps. Leur cytoplasme est très vacuolisé et des stades de division avec deux kinétoplastes sont fréquemment rencontrés ;

— autour de 150 heures, les formes amastigotes précédemment décrites coexistent avec des formes flagellées épimastigotes simples ou en cours de division longitudinale (*fig. 1 E*) ;

— à 170 heures et au-delà, une population très polymorphe faite d'amastigotes, de promastigotes, d'épimastigotes et surtout de trypomastigotes est observée.

Les trypomastigotes sont très mobiles à l'examen à frais. Après fixation et coloration, ils apparaissent soit effilés (22 μm) (*fig. 1 F*), soit plus trapus (12 μm) (*fig. 1 G*). Le noyau est coloré de façon uniforme, le cytoplasme est homogène, sans vacuole. Le kinétoplaste est proche de l'extrémité postérieure du parasite.

Pour *T. everetti*, *T. davidmolyneuxi* et *T. gentilini*, des gorgements effectués pour des expériences de transmission (cf. plus bas) ont montré que l'évolution chronologique était comparable à celle de *T. chabaudi* décrite ci-dessus.

DÉVELOPPEMENT EN CULTURE

Les cultures ont été réalisées avec le sang de l'Oiseau parasité à la fois par *T. davidmolyneuxi*, *T. gentilini* et *T. everetti*.

L'examen de la phase liquide du milieu de culture ne permet d'observer les parasites qu'à partir du 5^e jour. Il s'agit principalement de formes flagellées avec ou sans membrane ondulante. Elles sont d'aspect et de taille très variés. Le kinétoplaste est toujours en position juxta nucléaire. De nombreuses formes en cours de division sont observées (*fig. 2 A à G*).

En l'absence de repiquage, ces éléments deviennent très nombreux mais n'évoquent pas vers l'aspect trypomastigote. Ils peuvent être très nombreux jusqu'au 33^e jour de culture. Le milieu s'épuisant, leur nombre décroît progressivement, puis ils disparaissent.

Après repiquage à J5, nous observons la maturation des parasites et l'apparition des stades trypomastigotes dès le 7^e jour, mais les différentes expériences de transmission (cf. plus bas) semblent indiquer qu'ils ne sont infectants qu'à J13.

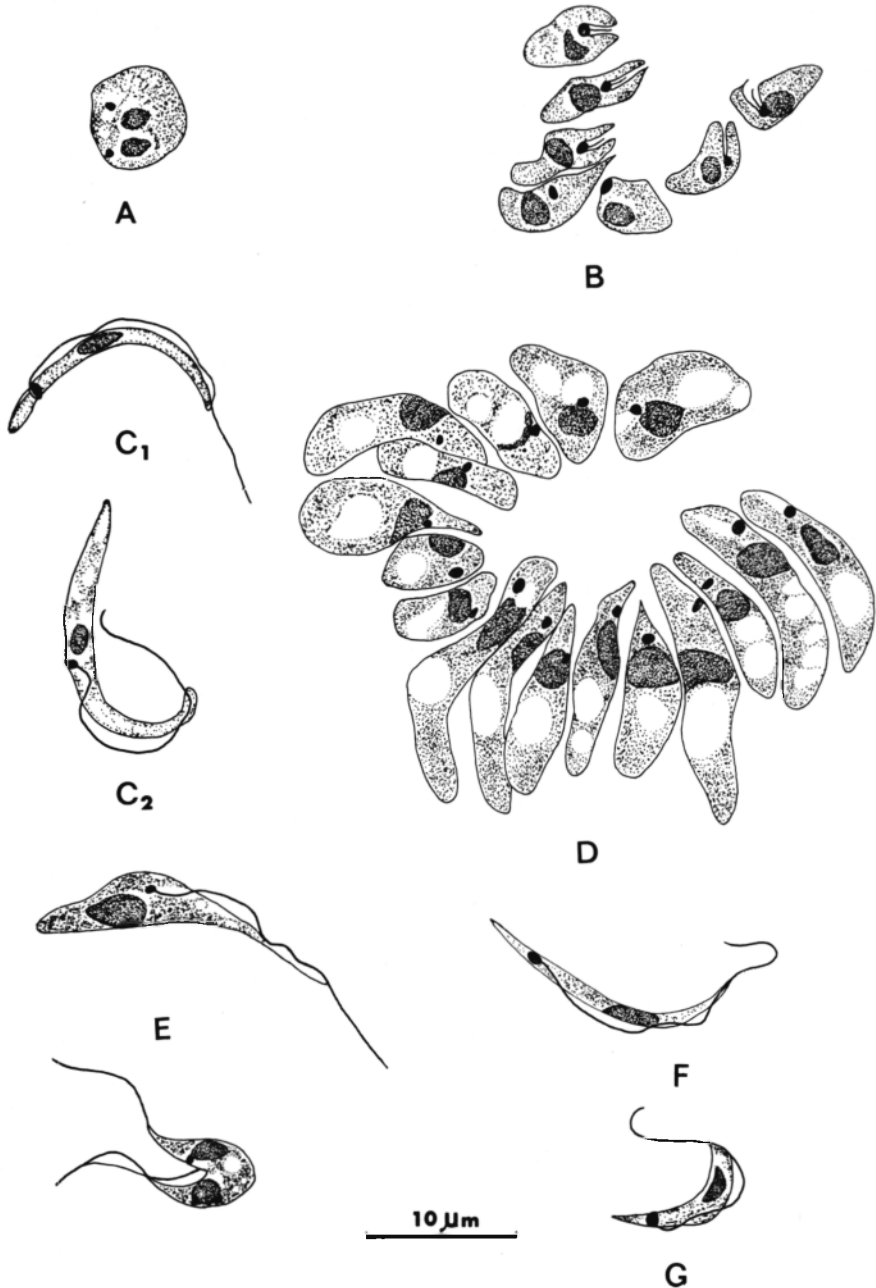


FIG. 1. — Formes de développement de *Trypanosoma chabaudi* chez *Culicoides nubeculosus* : A : amastigote en cours de division (20 h) ; B : amas d'amastigotes (24-48 h) ; C1 et C2 : formes flagellées rencontrées de façon exceptionnelle à 48 heures ; D : gros amastigotes vacuolés (70-150 h) ; E : en haut, épimastigotes simples et en bas, en cours de division (150 h) ; F et G : trypomastigotes infestants (170 h).

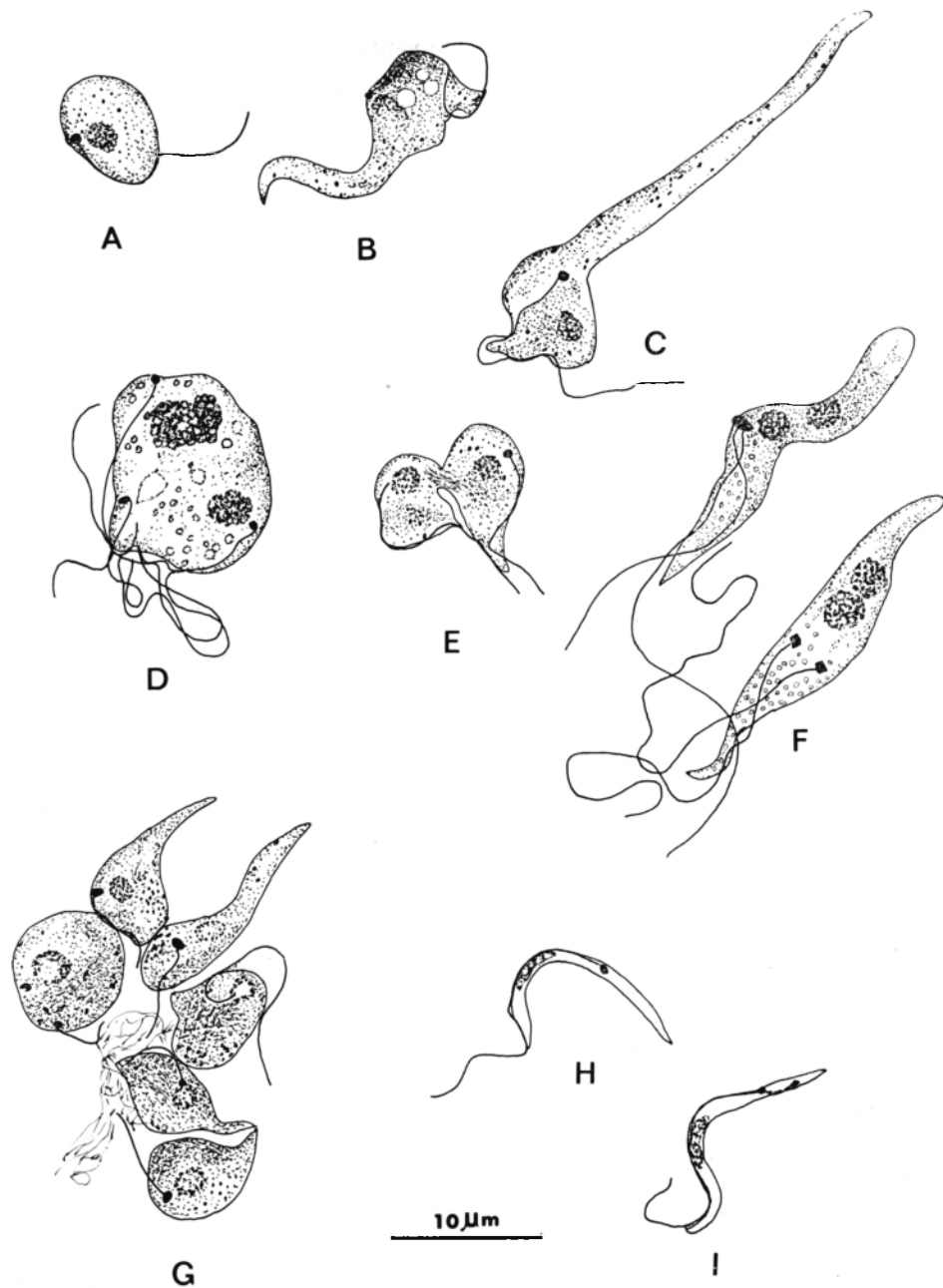


FIG. 2. — Développement des Trypanosomes d'un *Estrilda melpoda* sur milieu NNN :
 A à G : formes de multiplication ; H et I : formes trypomastigotes infestantes.

A J13, de nombreux trypomastigotes effilés sont présents. Ils mesurent, hors flagelle, de 11 à 13 μm . Le noyau est allongé et le kinétoplaste, souvent volumineux, est parfois constitué de deux masses distinctes (fig. 2 H et I). En l'absence de nouveau repiquage, ils disparaissent et ne persistent alors que les formes de multiplication décrites précédemment.

EXPÉRIENCES DE TRANSMISSION

Elles sont réalisées avec les formes trypomastigotes obtenues soit chez *Culicoides*, soit en culture sur milieu NNN.

AVEC *Culicoides*

Trois tentatives ont été effectuées à partir de Trypanosomes développés chez *Culicoides*.

1) *T. davidmolyneuxi* présent chez *E. melpoda* :

— maturation en 7 jours chez *C. nubeculosus* ;

— injection intrapéritonéale de trypomastigotes à un autre *E. melpoda* négatif au cours de quatre examens effectués pendant les six mois précédents ;

— l'oiseau receveur est resté négatif jusqu'à sa mort, trois semaines plus tard. Au cours de cette période, il a été examiné deux fois et des *Culicoides* ont été gorgés sur lui une fois sans résultat.

2) *T. chabaudi* présent chez *E. melpoda* :

— maturation en 7 jours chez *C. nubeculosus* ;

— injection intramusculaire de trypomastigotes à un *E. astrild* ;

— lors d'un premier examen de l'Oiseau trois jours plus tard, nous nous sommes aperçus qu'il hébergeait *T. everetti*, passé inaperçu auparavant. Au deuxième examen, à un mois, *T. chabaudi* était également présent. Des examens ont été effectués à 4, 5 et 6 mois. *T. chabaudi* n'a pas été retrouvé et *T. everetti*, une seule fois à 4 mois. Il s'agit donc d'une infection fugace qui n'a pas permis d'approfondir l'expérience.

3) *T. chabaudi* présent chez *E. melpoda* :

— maturation en 7 jours chez *C. nubeculosus* ;

— ingestion, par un *Estrilda melpoda*, de *Culicoides* infestés. L'Oiseau s'était avéré négatif lors de deux examens de sang et d'un gorgement de *Culicoides* réalisés au cours des dix jours précédents ;

— l'hôte receveur s'est révélé positif dès le premier examen, 48 heures après l'infestation.

Le Trypanosome nouvellement observé est morphologiquement proche de *T. chabaudi* ; comme lui, il est fusiforme, régulier, aux extrémités effilées. Néanmoins, il est plus petit (40 μm contre 45 μm), son kinétoplaste est plus éloigné du noyau (6,5 μm contre 4 μm) et le cytoplasme homogène et toujours régulièrement

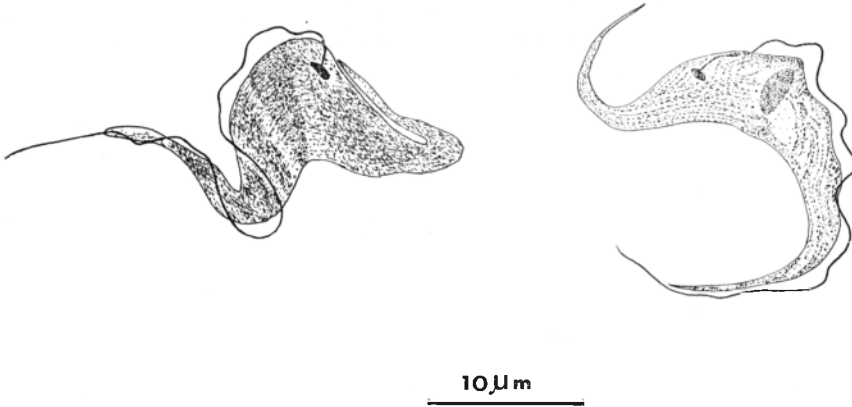


FIG. 3. — *Trypanosoma chabaudi*.
A gauche : infection naturelle. A droite : infection expérimentale.

strié chez *T. chabaudi*, est ici granuleux, parfois vacuolé et les striations sont peu nettes.

D'autre part, alors que *T. chabaudi* chez son hôte naturel se développe aisément chez *Culicoides nubeculosus*, 9 tentatives d'infection de ce vecteur à partir du nouvel Oiseau (à J15, J22, J54, J80, J96, J107, J123, J151, J272, J325 après l'infection) ont échoué. Un essai de culture en milieu NNN (à J335) a également échoué.

— La parasitémie apparue à la suite de cette infestation augmente régulièrement pendant les trois mois suivants. Malgré quelques fluctuations, elle persiste à un niveau très élevé plus de 16 mois après son apparition.

A PARTIR DES CULTURES

Cinq tentatives sont effectuées avec des formes trypomastigotes obtenues en milieu NNN dans les conditions décrites plus haut. Rappelons qu'il s'agit de la culture du sang d'un *Estrilda melpoda* porteur de trois espèces de Trypanosomes : *T. everetti*, *T. gentilini* et *T. davidmolyneuxi*.

Chaque Oiseau receveur a été inoculé par les trois voies, intramusculaire, intrapéritonéale et intradermique.

Il s'agit de trois *Estrilda melpoda* dont l'absence d'infection préexistante a été vérifiée par au moins deux prélèvements sanguins dans le mois précédent l'expérience.

a) *Estrilda melpoda* n° 1.

Deux tentatives ont été réalisées sur cet Oiseau à 25 jours d'intervalle :

— injection de trypomastigotes obtenus après 7 jours de culture : pas de Trypanosome retrouvé dans le sang de l'Oiseau aux contrôles effectués aux 5^e et 25^e jours ;

— injection de trypomastigotes obtenus après 12 jours de culture : pas de Trypanosome retrouvé dans le sang de l'Oiseau aux contrôles effectués au 3^e jour et au 3^e mois.

b) *E. melpoda* n° 2.

Injection de trypomastigotes obtenus après 9 jours de cultures : pas de Trypanosome retrouvé dans le sang de l'Oiseau aux contrôles effectués aux 3^e, 26^e et 30^e jours et au 2^e mois.

c) *E. melpoda* n° 3.

Dans un premier temps, une inoculation de trypomastigotes obtenus après 8 jours de culture est effectuée. L'examen du sang périphérique aux 2^e et 5^e jours étant négatif et ne disposant pas d'autre Oiseau négatif, une injection de trypomastigotes présents dans des cultures de 13 jours de culture est effectuée.

Lors du premier contrôle réalisé trois jours plus tard, des Trypanosomes sont trouvés dans le sang de l'Oiseau. Il s'agit de parasites ayant l'aspect de *T. davidmolineuxi*. Les contrôles effectués tous les mois pendant les quatre mois suivants montrent une parasitémie faible mais constante due à cette seule espèce.

Au cours de cette période, des Culicoïdes ont été gorgés deux fois sur l'Oiseau. Aucun développement du parasite dans l'estomac des insectes n'a pu être observé.

Par ailleurs, deux ensemencements de milieux de culture ont été réalisés. Des contrôles réguliers de ces milieux pendant 10 jours sont restés négatifs.

Discussion

RÔLE DES CULICOÏDES COMME VECTEURS DES TRYPANOSOMES AVIAIRES

L'importance des Culicoïdes en tant que vecteurs des Trypanosomes aviaires semble avoir été jusqu'alors sous-estimé puisqu'à notre connaissance il n'existe que deux études (Bennet, 1961 ; Miltgen et Landau, 1982) rapportant cette possibilité.

Tous les gorgements effectués ici sur des oiseaux présentant une infection naturelle décelable à l'examen direct donnent des résultats positifs.

De plus, deux faits marquants apparaissent :

1 — L'évolution est similaire pour tous les types de Trypanosomes, tant du point de vue morphologique que du point de vue chronologique.

2 — Le développement se déroule selon une succession de stades de multiplication amastigotes, suivis de l'apparition de formes flagellées d'abord promastigotes, puis épimastigotes, enfin trypomastigotes.

Ces résultats sont superposables à ceux rapportés dans l'étude de Miltgen et coll. (1982).

Ils diffèrent par contre de ceux obtenus par Bennett (1961) chez *Culicoides*, mais également de ceux de différents auteurs (revue par Baker, 1976) chez d'autres

vecteurs. Ces études ne relatent en effet que la présence de formes flagellées, sans que jamais ne soit signalée cette importante phase d'évolution sous forme amastigote.

ÉVOLUTION EN CULTURE

Nos résultats sont ici tout à fait comparables à ceux de la littérature (Thiroux, 1905 ; Woodcock et Lond, 1914 ; Marullaz, 1914 ; Baker, 1956 et 1966), à savoir :

— apparition des formes métacycliques entre 10 et 15 jours de culture après un repiquage au 5^e jour ;

— multiplication du parasite sous forme d'éléments de taille et d'aspect très variés, avec ou sans noyau visible, sans ou avec 1, 2 voire 4 flagelles.

INTERPRÉTATION DES EXPÉRIENCES DE TRANSMISSION

Il est impossible d'avoir la certitude que les Oiseaux que nous pensons avoir infectés expérimentalement étaient indemnes. Cependant plusieurs examens préalables ont été négatifs et le Trypanosome est apparu très peu de temps après l'inoculation.

L'interprétation des trois résultats positifs obtenus lorsque nous inoculons, à partir de *Culicoides* ou de cultures, des Trypanosomes à des Oiseaux neufs, est difficile en raison des particularités des infections obtenues.

1 — Dans un cas, la parasitémie obtenue chez le nouvel Oiseau a été fugace, dans les deux autres cas, il y a eu multiplication du parasite.

2 — Dans un cas, le Trypanosome transmis présente quelques différences morphologiques avec celui d'origine, dans deux cas, il est identique.

3 — Malgré des tentatives répétées, nous n'avons pas réussi à obtenir un nouveau développement en culture ou chez *Culicoïde* des deux Trypanosomes transmis.

Le fait le plus marquant est donc l'impossibilité d'obtenir un nouveau développement chez *Culicoïde* ou en culture, alors que nous n'avons jamais d'échec lorsqu'il s'agit d'une infection naturelle.

L'hypothèse d'une infectivité saisonnière des formes sanguines des Trypanosomes pourrait être évoquée. Des tentatives infructueuses de transmission durant une année complète rendent cette hypothèse peu probable.

L'absence chez les *Culicoïdes* d'un facteur indispensable à la maturation complète des trypomastigotes nous paraît plus vraisemblable. Le parasite transmis, même s'il peut se diviser chez l'Oiseau, n'est plus capable d'évoluer normalement et d'infecter des *Culicoïdes* ou les cultures.

De même, nous avons obtenu à partir de cultures de *T. davidmolyneuxi* l'infection d'un nouvel Oiseau par un Trypanosome apparemment identique à celui de l'Oiseau naturellement infecté. Il ne s'est développé ni en culture ni chez *Culicoïde*. Une carence d'un facteur de maturation qui resterait à déterminer, peut là encore être envisagé.

BIBLIOGRAPHIE

- BAKER J. R. : Studies on *Trypanosoma avium* Danilewsky 1885. I. Incidence in some birds of Hertfordshire. *Parasitology*, 1956, 46, 308-320.
- BAKER J. R. : Studies on *Trypanosoma avium*. IV. The development of metacyclic trypanosomes in culture grown *in vitro*. *Parasitology*, 1966, 56, 15-19.
- BAKER J. R. : Biology of the Trypanosomes of Birds. In: Lumsden W. H. R. and Evans D. A., Biology of kinetoplastida. Vol. 1. *Academic Press Inc.*, London, 1976, 131-174.
- BENNETT G. F. : On the specificity and transmission of some avian trypanosomes. *Can. J. Zool.*, 1961, 39, 17-33.
- CHANDENIER J., LANDAU I., BACCAM D. : Sur les Trypanosomes d'oiseaux Estrildidae. — Étude morphologique et systématique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1988, 63, 184-192.
- MARULLAZ M. : Contribution à l'étude des trypanosomes des oiseaux, deux espèces nouvelles. *Bull. Soc. Pathol. exot.*, 1914, 7, 115-117.
- MILTGEN F., LANDAU I. : *Culicoides nubeculosus*, vecteur expérimental d'un nouveau Trypanosome de Psittaciforme : *Trypanosoma bakeri* n. sp. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1982, 57, 423-428.
- THIROUX A. : Recherches morphologiques et expérimentales sur *Trypanosoma paddae* (Laveran et Mesnil). *Ann. Inst. Pasteur*, 1905, 19, 65-82.
- WOODCOCK H. M., LOND D. S. : Studies on avian haemoptoroza: No. III. Observations on the development of *Trypanosoma noctuae* (of the little owl) in *Culex pipiens*; with remarks on the other parasites occurring. *Q. J. Microsc. Sci.*, 1914, 60, 399-433.
-