DESCRIPTION D'*EIMERIA MULARDI* N. SP. CHEZ LE CANARD MULARD. ETUDE DE LA PHASE ENDOGENE DE SON CYCLE EVOLUTIF AVEC MISE EN EVIDENCE DU DEVELOPPEMENT INTRANUCLEAIRE.

CHAUVE C.M., REYNAUD M.C., GOUNEL J.M.*

Summary : DESCRIPTION OF *EIMERIA MULARDI* N. SP. FROM MULE DUCKS. STUDY OF THE ENDOGENOUS CYCLE WITH EVIDENCE OF INTRANUCLEAR DEVELOPMENT.

A new species of coccidium, *Eimeria mulardi* n. sp., has been described from the mule duck. The endogenous cycle is studied in experimentally infected ducks. At least two generations of meronts were observed, mainly in the *lamina propria* of jejunum and ileon and the gametogony occurred principally in glandular cells of the intestinal tract, except in duodenum. All the endogenous stages were localized in the nucleus of the cell.

KEY-WORDS : *Eimeria mulardi* n. sp. Duck. Life-cycle. Intranuclear development.

Résumé :

Les auteurs décrivent une nouvelle espèce de coccidie parasite du canard : *Eimeria mulardi*. Par infection expérimentale, ils étudient la phase endogène de son cycle évolutif. Ils mettent en évidence au moins deux mérogonies qui se déroulent préférentiellement dans la *lamina propria* du jéjunum et de l'iléon et une gamétogonie qui s'accomplit principalement dans les cellules glandulaires de tout l'intestin excepté dans le duodénum. Tous les stades endogènes ont un développement intranucléaire.

MOTS CLES : *Eimeria mulardi* n. sp. Canard. Cycle évolutif. Développement intranucléaire.

INTRODUCTION

Les coccidies parasites du canard en France sont encore peu connues. Le nombre d'espèces coccidiennes présentes et l'incidence pathogène de certaines d'entre elles ne sont pas bien précisés. Un premier inventaire, conduit dans des élevages landais de canards "mulard", a permis d'isoler sept espèces différentes (Chauve *et al.*, 1991). Une des espèces est apparue particulièrement intéressante car fréquemment isolée chez le canard mulard et rendue parfois responsable de mortalité dans les élevages.

Les caractères morphologiques de son oocyste sporulé ressemblent à ceux des oocystes sporulés d'*Eimeria aythiae* isolée en Amérique du Nord (Farr, 1965) chez des canards sauvages de l'espèce *Aythya affinis*. En revanche, le cycle évolutif, que nous avons reproduit expérimentalement, est très original, il ne peut être rattaché à aucun autre cycle de coccidie déjà décrite chez le canard. Ceci nous a amené à considérer qu'il s'agissait d'une espèce nouvelle et à proposer le binôme *Eimeria mulardi* pour nommer celle-ci.

Le but de la présente étude est de donner les caractères morphologiques de l'oocyste sporulé et surtout de décrire le cycle évolutif, en précisant ses différentes étapes, leur chronologie, et les sites électifs du développement des différents stades.

MATERIEL ET METHODE

Le principe de la méthode consiste en l'infection expérimentale de canettes et en des examens nécropsiques de celles-ci au terme de différents laps de temps, afin de caractériser les stades évolutifs du parasite. Des contrôles coproscopiques réguliers sont pratiqués pour établir la période prépatente chez les animaux d'épreuve et vérifier l'absence de contamination des animaux servant de témoins. Le temps de sporulation est recherché. Les oocystes simples et les oocystes sporulés sont décrits.

ANIMAUX

L'expérimentation porte sur 28 canettes "mulard" (hybrides d'une femelle Pékin, *Anas platyrhynchos*, et d'un mâle barbarie, *Cairina moschata*) destinées, pour les animaux d'épreuve, à être infectées à l'âge de 10 jours. Les animaux, réceptionnés à 1 jour, sont élevés sous lampe et sur paille dans un local isolé, à l'abri de toute contamination coccidienne. Ils reçoivent un aliment complet caneton-oison, exempt d'anticoccidien, fourni en mangeoire métallique, et l'eau leur est distribuée *ad libitum* par des abreuvoirs automatiques.

INOCULUM

Les oocystes sporulés d'*Eimeria*, utilisés comme inoculum, ont été obtenus à partir d'une souche isolée dans un élevage landais de mulards, en 1989. Cette

* Equipe Associée I.N.R.A. / E.N.V. de LYON, "Protozoaires Entériques du Canard", Laboratoire de Parasitologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, B.P. 83, 69280 Marcy l'Etoile, France.

souche, conservée à + 4° C dans du bichromate de potassium à 1 p. 100, a été entretenue au laboratoire par passages (intervalle de 3 à 6 mois) sur des canettes "mulard" âgées de 10 jours, le dernier passage ayant été réalisé 3 semaines avant l'expérimentation.

SCHÉMA EXPÉRIMENTAL

Les animaux sont séparés en 2 lots : 24 animaux destinés à être infectés et 4 utilisés comme témoins.

Animaux d'épreuve

Infection :

Au moment de l'inoculation à J0, après une diète hydrique de 12 heures, les 24 animaux sont changés de local et placés dans une cage à métabolisme équipée d'un plateau mobile permettant la récolte des fientes pour leur traitement ultérieur en coproscopie (1 fois par jour jusqu'à J4, puis 2 fois par jour de J4 à J6). Deux doses sont administrées par la voie buccale : 10^6 oocystes sporulés pour 8 animaux qui seront tués entre J 0,5 et J 2, et 10^5 oocystes sporulés pour les 16 autres, qui seront tués entre J 2,5 et J 6. Les animaux devant être sacrifiés sont mis à la diète hydrique pendant 12 heures. Des autopsies de 2 animaux sont réalisées toutes les 12 heures de J0,5 à J6 après l'infection, soit au total à 12 intervalles de temps.

Contrôles coproscopiques :

Ils sont faits par la méthode d'enrichissement par flottation à l'iodomercure de potassium (HgI_2 : 150 g ; KI : 110 g, H_2O : 300 g.) selon la fréquence indiquée précédemment (toutes les 24 heures jusqu'à J4 puis toutes les 12 heures).

Examens nécropsiques :

Pour chaque animal autopsié, des segments de 1 cm de longueur sont prélevés en 6 points du tube digestif : duodénum (anse duodénale), jéjunum antérieur, (en avant de la cicatrice vitelline), jéjunum postérieur (2 cm en arrière de la cicatrice vitelline), iléon, caecum et rectum. Ils sont fixés dans du formol à 10 p. 100, inclus en bloc de paraffine selon les techniques de routine, coupés en section de 5 μm puis colorés à l'Hémalun-Eosine-Safran.

Les coupes histologiques effectuées aux 12 temps d'autopsie sont examinées en microscopie photonique. Lorsque les stades endogènes sont mis en évidence (mérontes ou gamontes), une vingtaine d'entre eux sont mesurés et la moyenne des tailles est calculée.

Animaux témoins

Les 4 animaux témoins sont maintenus dans le local d'isolement et contrôlés quotidiennement par copro-

scopie. Deux d'entre eux sont sacrifiés à J6 et des prélèvements effectués dans les 6 portions intestinales précédemment définies serviront de témoins histologiques.

RESULTATS

OOCYSTES

Les oocystes sont subsphériques. Dans les oocystes fraîchement émis, le sporonte granuleux et dense remplit presque tout le volume (fig. 1). Les dimensions de 50 oocystes, extrêmes et moyennes, sont les suivantes :

Longueur de l'oocyste	18,9 - 23,2 μm	(21,3 μm)
Largeur de l'oocyste	15,6 - 21,1 μm	(17,1 μm)
Longueur des sporocystes	9,5 - 13,1 μm	(11,5 μm)
Largeur des sporocystes	6,3 - 9,0 μm	(7,9 μm)
Longueur des sporozoïtes	11,3 - 14,4 μm	(13,3 μm)
Largeur des sporozoïtes	2,1 - 3,6 μm	(3,0 μm)

La sporulation dans une solution de bichromate de potassium à 1 % a été obtenue en trois jours à 20°C.

La paroi lisse, incolore ou légèrement jaune verdâtre, a une épaisseur de 0,6 - 0,8 μm . Elle semble constituée de deux couches. Le micropyle a un diamètre de 1,6 - 2,4 μm (moyenne : 2,0 μm). Il est surmonté d'une calotte aplatie ou légèrement bombée (4,0 μm x 0,8 μm). A la base du micropyle la couche interne de la paroi interrompue présente des petites expansions. Ni granule polaire, ni reliquat oocystal ne sont observés (fig. 2 et 3). Le sporocyste est ovoïde, le pôle étroit est pointu et présente un petit corps de Stieda plus ou moins bien visible. Dans chaque sporocyste, on voit un volumineux reliquat sporocystal (5,7 μm x 4,1 μm) de structure granuleuse non compacte. Les sporozoïtes sont examinés après excystement, réalisé selon la technique décrite par Shirley, 1975. Ils apparaissent allongés légèrement incurvés avec un pôle pointu et un pôle arrondi et présentent deux ou plus souvent trois grosses masses réfringentes (fig. 4).

PHASE ENDOGÈNE DU CYCLE.

Localisation des stades endogènes

Localisation dans l'intestin

Dans nos conditions expérimentales, les mérogonies s'accomplissent préférentiellement dans le jéjunum postérieur et dans l'iléon. Dans les caecums, les mérontes sont moins nombreux, et dans le rectum, leur présence est encore plus rare. Le duodénum ne semble pas être un site de développement des formes asexuées. La gamétogonie a lieu dans toutes les portions intestinales, duodénum excepté.

Fig. 1. – Oocyste non sporulé de *E. mulardi*

Fig. 3.
Schéma de l'oocyste sporulé de *E. mulardi*.
Corps de Stieda (CS), masse réfringente (MR),
reliquat sporocyst (RS)

Fig. 2. – Oocystes sporulés de *E. mulardi*

Fig. 4. – Sporozoïte de *E. mulardi*

Localisation dans la muqueuse

Dans la muqueuse intestinale, c'est dans la *lamina propria* que les mérontes s'observent en plus grand nombre (fig. 5). Les cellules glandulaires sont moins parasitées et seuls quelques rares mérontes ont colonisé les villosités.

La localisation élective des gamontes est la cellule glandulaire (fig. 6) ; une même cellule pouvant héberger plusieurs gamontes. En revanche les villosités sont peu parasitées. Quelques rares gamontes sont observables dans la *lamina propria*. Outre la localisation classique intra-muqueuse, quelques gamontes sont aussi visibles dans le conjonctif de la musculuse.

Localisation dans la cellule

Dans les cellules, la localisation de tous les stades endogènes, mérontes et gamontes, est intranucléaire. Lorsqu'ils hébergent les gamontes mûrs, les noyaux parasités sont fortement hypertrophiés, leur taille pouvant être multipliée par 4 ou 5. De nombreux noyaux présentent une hyperchromatose marginale.

Développement des stades endogènes

Les mesures des mérontes figurent dans le tableau I. Les premiers mérontes sont décelés à J1. Aux temps J2,5 (fig. 7), J4,5 et J5 (fig. 8) nous avons pu observer de nombreux mérontes mûrs libérant leurs mérozoïtes : 7 à 10 mérozoïtes à J2,5 et 9 à 17 mérozoïtes à J4,5 et J5. A J3,5, des mérontes en grand nombre semblent proches de la maturité mais il n'a pas été possible de

compter leurs mérozoïtes. Aux temps J0,5, J1,5 et J2, aucun stade endogène n'a pu être mis en évidence.

Les mesures des gamontes figurent dans le tableau II. Les jeunes gamontes sont visibles à partir de J4,5 mais la différenciation, en microscopie photonique, entre les microgamontes et les macrogamontes n'est évidente qu'à J6 (fig. 9). Il n'est pas rare d'observer microgamonte et macrogamonte dans un même noyau.

Détermination de la période prépatente

Les tout premiers oocystes apparaissent dans les fèces entre J5,5 et J6.

Jour après l'infection	Tailles extrêmes	Moyennes	Nombre de mérozoïtes
J1	2,5-4,9 × 1,6-3,3	4,0 × 2,6	
J2,5	3,3-5,7 × 2,0-4,9	4,8 × 3,6	(7-10)
J3	1,6-3,7 × 1,6-2,5	2,6 × 1,9	
J3,5	3,3-6,6 × 2,5-4,9	4,5 × 3,0	
J4	1,6-4,1 × 1,6-3,7	2,7 × 3,3	
J4,5	2,5-8,2 × 2,5-6,6	6,0 × 4,4	(9-16)
J5	4,1-9,8 × 3,3-6,6	7,1 × 5,2	(12-17)

Tableau I.

Mensuration des mérontes d'*Eimeria mulardi* n. sp. (en µm)

Fig. 5. – Localisation des mérontes de *E. mulardi* dans la *lamina propria*.

Fig. 6. – Localisation des gamontes de *E. mulardi* dans les cellules glandulaires.

Fig. 7. – Mérontes de *E. mulardi* à J2,5.

Fig. 8. – Mérontes de *E. mulardi* à J4,5.

Fig. 9. – Macrogamètes (M) et microgamètes (m) de *E. mulardi* à J6.

Jour après l'infection	Gamontes jeunes		Macrogamontes		Microgamontes	
	Tailles extrêmes	Moyennes	Tailles extrêmes	Moyennes	Tailles extrêmes	Moyennes
J4,5	1,2-1,6 × 1,2-1,6	1,5 × 1,5				
J5	1,2-4,1 × 1,2-4,1	2,5 × 2,4				
J5,5	2,5-10,7 × 2,5-9,4	6,6 × 5,7				
J6			11,8-14,4 × 8,4-11,8	13,2 × 10,8	13,5-18,6 × 6,8-15,2	16,3 × 11,4

Tableau II. – Mensuration des gamontes d'*Eimeria mulardi* n. sp. (en µm).

DISCUSSION

Les oocystes d'*Eimeria mulardi* n. sp. ressemblent étroitement à ceux d'*Eimeria aythya* décrits par Farr (1965) chez des fuligules milouinans (*Aythya affinis*) en Amérique du Nord. Cette ressemblance morphologique nous avait conduits à identifier la coccidie isolée lors d'un premier inventaire (Chauve *et al.*, 1991) à *Eimeria aythya*. Dans la description de Farr il n'est pas fait mention de la taille des sporocystes et des sporozoïtes. Plus récemment Zuo *et al.* (1991) ont complété l'étude morphologique d'*E. aythya* et ont indiqué pour les sporocystes les mensurations suivantes : 7,7 - 12,5 µm x 4,6 - 7,2 µm (moyenne : 10,5 x 5,6 µm). Le diamètre du micropyle d'*E. aythya*, indiqué par Farr, 2,2 - 4,3 µm (moyenne : 3,6 µm), est supérieur à celui que nous avons mesuré chez *E. mulardi* n. sp., 1,6 - 2,4 µm (moyenne : 2,0 µm). Les autres caractères (taille, forme, présence d'une calotte micropylaire, épaisseur de la paroi, corps de Stieda, reliquats sporocystaux) sont identiques.

En revanche, la morphologie d'*E. mulardi* n. sp. est différente de celles des autres coccidies décrites chez le canard. Si l'espèce *E. anatis* Scholtyseck, 1955, citée comme présente en France (Dorchies, 1985 ; Euzéby, 1987), possède quelques similitudes morphologiques avec *E. mulardi* n. sp. (forme, présence éventuelle d'un bouchon micropylaire), un certain nombre de caractères permettent de les différencier : les dimensions des oocystes d'*E. anatis* sont inférieures : 14,4 - 19,2 µm x 10,8 - 15,6 µm (moyenne : 16,8 x 14,1 µm), il existe un corpuscule (opercule d'Allan) et les reliquats sporocystaux sont très réduits. C'est surtout l'étude de la phase endogène du cycle évolutif d'*E. mulardi* n. sp. qui conduit à l'identifier comme une nouvelle espèce. La reproduction expérimentale de l'infection nous a permis de déterminer la chronologie de la phase endogène et la localisation

des stades asexués et des stades sexués. Nous avons pu mettre en évidence deux générations de mérontes différant entre elles par la taille des mérontes et le nombre de mérozoïtes (la première à J2,5 et la deuxième à J4,5-J5). La lecture du tableau I suscite deux interrogations : - l'évolution de la taille moyenne des mérontes entre J2,5 et J4,5 peut laisser supposer l'existence d'une autre génération intermédiaire, mais, pour l'instant, nous n'avons pas pu confirmer cette supposition ; - à J1, on observe déjà des mérontes mesurant 4,0 µm x 2,6 µm, à J1,5 et à J2 aucun élément parasite n'a pu être décelé et à J2,5 les mérontes observés ont une taille peu supérieure à celle des mérontes observés à J1. Ceci pourrait être en faveur d'une première génération de mérontes, située entre J1 et J2,5. Dans ce cas, la phase asexuée pourrait comporter jusqu'à quatre mérogonies. Par ailleurs, la présence de très nombreux gamontes en fin de cycle, colonisant pratiquement toutes les cellules glandulaires, indique une multiplication très importante et serait en accord avec un nombre élevé de mérogonies.

Dans nos conditions expérimentales, les stades endogènes semblent coloniser tout l'intestin, excepté le duodénum, et la position dans la muqueuse est différente pour les stades asexués et les stades sexués. Les mérontes sont surtout présents dans la *lamina propria* tandis que les gamontes se développent préférentiellement dans les glandes intestinales. Si l'on veut poursuivre la comparaison avec *E. aythya*, il apparaît que la localisation des stades endogènes est différente. Windingstad *et al.*, en 1980, ont mentionné la présence "de volumineux mérontes dans les glandes de Lieberkühn, et de mérozoïtes dans la *tunica propria*". Farr, en 1965, fait état de la présence élective "de macrogamontes et d'oocystes en voie de lyse dans le tissu interglandulaire, alors que seul un petit nombre de macrogamontes s'observe dans la glande elle-même".

Mais l'originalité de cette coccidie est surtout d'accomplir ses mérogonies et sa gamétogonie dans

le noyau même de la cellule parasitée. Jusqu'à ce jour, parmi les coccidies aviaires, il était connu un cycle évolutif, en partie ou en totalité, intranucléaire pour cinq coccidies de l'oie : *E. hermani* (Skene, Fernando, 1990), *E. kottani* (Antukhaev, 1977), *E. nocens* (Ponizovskii, Shibalova, 1978), *E. stigmosa* (Gajadhar *et al.*, 1986) et *Tyzzeria parvula* (Shibalova, Morozova, 1979). Sauf *E. hermani* dont la gamétogonie est intracytoplasmique, ces espèces accomplissent à la fois leurs mérogonies et leur gamétogonie dans le noyau.

Aujourd'hui, *E. mulardi* n. sp. est donc la première espèce coccidienne du canard pour laquelle un développement intranucléaire est décrit. Ceci confirme, ce que Gajadhar écrivait (Gajadhar *et al.*, 1986) : "d'autres coccidies intranucléaires seront décrites chez les ansériformes".

Nos infections expérimentales ont également permis de déterminer la durée de la période prépatente (entre 5,5 et 6 jours). Des études ultérieures en microscopie électronique devraient nous permettre de donner une description plus détaillée du cycle évolutif.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le laboratoire d'Histologie et d'Anatomie Pathologique (J. Gastellu) de l'E.N.V.L., pour la réalisation des coupes histologiques et C. Dang-Quoc pour sa collaboration technique.

REFERENCES

- ANTUKHAEV I.K. : The ultrastructure of *Eimeria kottani* Graubmann and Gräfner, 1964 (Sporozoa, Coccidia). I. Intranuclear development of the macrogamete. *Tsitologiia*, 1977, 19, 228-292 (in Russian).
- CHAUVE C.M., GOUNEL J.M., REYNAUD M.C. : Les coccidies du canard mulard. Bilan d'une première enquête réalisée dans trois élevages du Sud-Ouest de la France. *Avian Pathology*, 1991, 20, 713-719.
- DORCHIES P. : Les parasitoses de l'oie et du canard. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 1985, 136, 505-519.
- EUZÉBY J. : *Protozoologie médicale comparée. Vol. II. Myxozoa. Microspora. Ascetospora. Apicomplexa, 1. Coccidioses* (s.l.), 1987 (Lyon, Fondation Marcel Mérieux).
- FARR M. M. : Coccidiosis of the lesser scaup duck, *Aythya affinis* Eyton, 1838 with a description of a new species, *Eimeria aythiae*. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 1965, 32, 236-238.
- GAJADHAR A.A., RAINNIE D.J., CAWTHORN R.J. : Description of the goose coccidium *Eimeria stigmosa* Klimes, 1963, with evidence of intranuclear development. *J. Parasit.*, 1986, 72, 588-594.

- PECKA Z. : Life cycle and ultrastructure of *Eimeria stigmosa* the intranuclear coccidian of the goose (*Anser anser domesticus*). *Folia Parasitologica*, 1992, 39, 105-114.
- PONIZOVSKII A.K., SHIBALOVA T.A. : Electron microscope study of the penetration of the merozoites of *Eimeria nocens* (Sporozoa, Coccidia) into the nucleus of the epithelial cells of the intestine of geese. Fourth International Congress of Parasitology, Warsaw. Short Communications, 1978, Section B : 72. (in Russian).
- SCHOLTYSECK E. : *Eimeria anatis* n. sp., ein neues Coccid aus der Stockente (*Anas platyrhynchos*). *Arch. Protistenk.*, 1955, 100, 431-434.
- SHIBALOVA T.A., MOROZOVA T.I. : Intranuclear development of the macrogamete of the coccidian *Tyzzeria parvula*. *Tsitologiia*, 1979, 21, 969-972 (In Russian).
- SHIRLEY M.W. : Enzyme variation in *Eimeria* species of the chicken. *Parasitology*, 1975, 71, 369-376.
- SKENE R.C., FERNANDO M.A. : *Eimeria hermani* Farr, 1953 of the Canada goose, *Branta canadensis* : endogenous development, including intranuclear schizogony, in the domestic goose (*Anser anser domesticus*). *Can. J. Zool.*, 1990, 68, 2424-2428.
- WINDINGSTAD R.M., McDONALD M.E., LOCKE L.N., KERR S.M., SINN J.A. : Epizootic of coccidiosis in free-flying lesser scaup. *Avian diseases*, 24, 1044-1049.
- ZUO Y.X., SONG X.L., LIN Y.Y., TU Y. : Surveys on the species of coccidia in domestic ducks in Yunnan, China. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 1990, 9, 13-16.

Accepté le 30 septembre 1993