

SOMMAIRE

Introduction.....	1
Présentation du terrain de stage : Institut Pasteur de Madagascar-Groupe de recherche sur le paludisme.....	3
▪ Présentation générale de l'Institut Pasteur.....	3
▪ Situation du paludisme à Madagascar.....	4
▪ Présentation du Groupe de Recherche sur le Paludisme (GRP).....	4
Généralités sur le paludisme aviaire.....	5
▪ L'avifaune de Madagascar.....	5
▪ Hématozoaires aviaires : <i>Haemoproteus</i> , <i>Plasmodium</i> et <i>Leucocytozoon</i>	6
Récolte des prélèvements.....	9
▪ Site de capture	9
▪ Prélèvements.....	10
▪ Résultats (Annexe 3).....	11
▪ Discussion.....	11
Etude moléculaire.....	12
▪ Phylogénie du genre <i>Plasmodium</i> . Positionnement de <i>P. falciparum</i>	12
▪ Choix des séquences et des amorces.....	13
▪ Mise au point des réactions PCR.....	15
▪ Analyse phylogénique : Construction d'un arbre.....	16
Conclusion.....	17
Bibliographie.....	18

Annexes

Annexe 1 : Article de revue générale : Endoparasites of Malagasy birds.

Annexe 2. Photographies du site de capture des oiseaux.

Annexe 3. Compte rendu de mission : liste des oiseaux capturés et résultats microscopiques.

Annexe 4. Alignement de séquences cytochrome b.

Annexe 5. Alignement et chromatogramme de séquences reçues.

INTRODUCTION

Depuis Darwin, il est communément admis que les êtres vivants descendent tous les uns des autres et que toute classification véritable est généalogique. Les êtres vivants sont donc reliés entre eux par des liens plus ou moins étroits de filiation que tente de retracer la phylogénie. Ainsi, la phylogénie fournit un moyen de classer les organismes en fonction de leur parenté (Solignac M. *et al.*, 1995). Jusqu'aux années 1960, les comparaisons entre des morphologies, des comportements et des répartitions géographiques des espèces étaient les seuls moyens disponibles pour établir des classifications et phylogénies. La découverte des informations contenues dans les séquences des macromolécules a fourni un nouveau moyen d'étude : la phylogénie moléculaire.

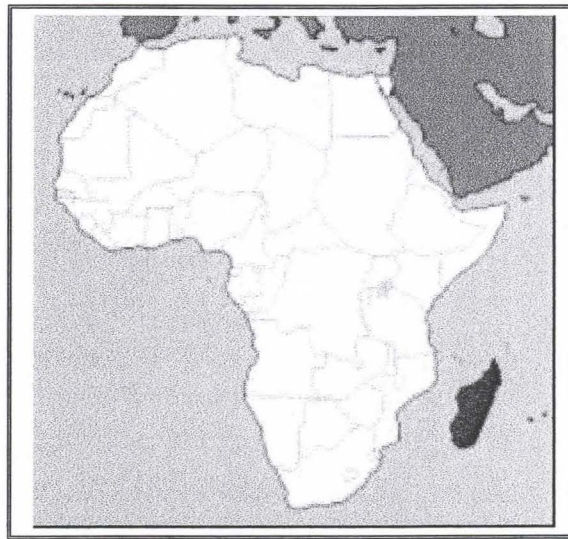
En s'appuyant sur ces principes de phylogénie, de nombreuses théories ont été échaufaudées pour décrire l'histoire évolutive du genre *Plasmodium* mais actuellement aucune d'entre elles n'est uniformément acceptée. Le genre *Plasmodium* comprend près de 200 espèces connues à ce jour. Ces protozoaires sont des parasites intracellulaires obligatoires de vertébrés, capables de se développer uniquement chez les lézards, les oiseaux, les rongeurs et les primates. Les premières classifications taxinomiques étaient basées sur des critères biologiques, morphologiques et occasionnellement cliniques. Garnham (1966) a concrétisé les idées qui étaient alors courantes en construisant neuf sous-genres, dont trois spécifiques de mammifères, quatre des espèces aviaires et deux de reptiles.

Les quatre espèces de *Plasmodium* rencontrées chez l'homme (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*) présentent des similitudes avec des plasmodiums simiens. Cependant, différentes études ont montré que *Plasmodium falciparum* serait phylogénétiquement plus proche des espèces aviaires. L'introduction de *P. falciparum* chez l'homme proviendrait d'un transfert horizontal qui aurait eu lieu il y a environ 7 à 10.000 ans. Cette arrivée récente de *P. falciparum* chez l'homme expliquerait sa plus grande virulence.

C'est dans ce contexte d'étude de passage de barrière d'espèces que le sujet du stage que j'ai effectué à l'Institut Pasteur de Madagascar a été défini. L'objectif principal de ce stage de 4 mois était donc de contribuer à l'élaboration d'une phylogénie des plasmodies et autres hématozoaires aviaires endémiques de Madagascar en vue de positionner *Plasmodium falciparum*, au sein de cette phylogénie.

Une présentation de l'Institut Pasteur de Madagascar et du groupe de recherche sur le paludisme permettra de préciser le terrain de stage et dans quel cadre de recherche ce travail a eu lieu. Par la suite

les différentes étapes du stage seront abordées. Un premier inventaire sur les endoparasites d'oiseaux à Madagascar m'a permis d'acquérir une connaissance globale de la population parasitaire aviaire endémique et a été l'occasion d'écrire un article de revue générale. La récolte de prélèvements sanguins d'oiseaux s'est déroulé lors d'une mission sur le terrain et a permis d'obtenir des spécimens parasitaires aviaires qui ont fait, par la suite, l'objet des études moléculaires, dernière étape du stage. D'une façon plus générale, ce travail trouve sa place dans un programme de recherche plus large de veille microbiologique, cherchant à définir les risques et les conditions minimales nécessaires au transfert horizontal de parasites d'espèces sauvages à l'homme.



Localisation géographique de Madagascar

PRESENTATION DU TERRAIN DE STAGE : INSTITUT PASTEUR DE MADAGASCAR
GROUPE DE RECHERCHE SUR LE PALUDISME

♦ **Présentation générale de l'Institut Pasteur de Madagascar**

L'Institut Pasteur de Madagascar (IPM), créé en 1898, est un institut franco-malgache, établissement de l'Institut Pasteur, sous tutelle du Ministère de la Santé de Madagascar et reconnu d'utilité publique. Les missions principales de l'Institut Pasteur de Madagascar concernent quatre domaines : recherche, santé publique, service et formation.

Activités de recherche

L'IPM se voit confier le volet recherche des axes prioritaires de la Politique Nationale de Santé et participe aux grandes interventions en matière de Santé Publique. Si des domaines de recherche y sont particulièrement développés, paludisme, peste, tuberculose, bilharzioses et maladies virales, d'autres thèmes peuvent être définis en fonction des circonstances épidémiologiques et des échanges d'idées entre scientifiques.

Activités de santé publique

Les différentes unités de l'IPM interviennent dans des actions de Santé publique, certaines directement en tant que centres de référence OMS ou nationaux, d'autres par leur participation active à la surveillance épidémiologique. L'IPM abrite plusieurs centres ou laboratoires de référence :

- Centre Collaborateur OMS pour la Peste
- Laboratoire National de Référence pour les Mycobactéries
- Laboratoire National de Référence OMS pour la Grippe et pour la Poliomyélite
- Laboratoire National de Référence pour la Rage et pour le VIH/ SIDA
- Centre de Référence National pour les Arbovirus et Fièvres Hémorragiques Virales
- Laboratoire Central de la Bilharziose et de la Cysticercose
- Laboratoire National de Référence d'Analyse des Eaux dans les Industries Agro-alimentaires et de Contrôle des Denrées Animales ou d'Origine Animale.

Activités de service

Les activités de service sont essentiellement exercées par le Centre de Biologie Clinique (CBC) qui assure les analyses de biologie médicale, le service de vaccination, le centre antirabique et le laboratoire d'Hygiène des Aliments et de l'Environnement (LHAE).

Activités de formation

Elles correspondent à l'accueil à l'IPM de nombreux stagiaires, DEA et thèses et également à l'encadrement de la formation de techniciens de laboratoire de l'Ecole d'Enseignement Médico-social du Ministère de la Santé.

◆ Situation du Paludisme à Madagascar

Première cause de morbidité, une mortalité importante bien que difficile à apprécier, le paludisme est à Madagascar à l'origine d'une consultation sur cinq dans les dispensaires de l'île. Il reste en tête de liste des préoccupations nationales en matière de santé publique. La grande île offrant des écosystèmes très variés (tropical humide, tropical sec, tropical d'altitude, sub-aride, et un climat de montagne), les conditions de transmission du paludisme sont ainsi très hétérogènes allant de l'absence complète de transmission sur les massifs montagneux aux zones d'endémie stable sur les côtes. Autre particularité : les quatre espèces de plasmodies humaines (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*) sont retrouvées à Madagascar, elles sont transmises par des vecteurs de type africains (*An. gambiae* *sl.*, *An. funestus*) mais aussi endémique (*An. mascarensis*).

◆ Présentation du Groupe de Recherche sur le Paludisme (GRP)

La recherche sur le paludisme à l'IPM est coordonnée par le Groupe de Recherche sur le Paludisme (GRP) créé en 2000. Il regroupe, autour de l'unité paludisme, l'ensemble des personnes impliquées dans la recherche sur le paludisme à l'IPM dans les unités d'immunologie, d'épidémiologie et d'entomologie mais aussi les partenaires de l'IRD travaillant sur le paludisme à Madagascar.

Le programme de recherche comprend deux principaux volets. Le premier concerne la mise en place d'un véritable réseau de recueil de prélèvements couvrant l'ensemble du territoire malgache, dans le cadre d'étude de la résistance aux antipaludiques. Cette surveillance est particulièrement intéressante dans un pays encore relativement épargné par la chloroquinorésistance (taux de résistance inférieur à 20 %). Le second point correspond à la création d'une équipe formée à l'étude du polymorphisme génétique au sein des populations de parasites et vecteurs du paludisme (personnels, matériels et méthodologies). Les principaux axes de recherche du GRP correspondent à :

- une étude de la transmission visant à déterminer les paramètres immunologiques et génétiques pouvant influencer le passage homme/moustique, ainsi que la mise au point de modèles descriptifs et prédictifs en matière de dynamique des populations vectorielles (notamment par l'utilisation de la télédétection et des systèmes d'information géographique),
- une approche du paludisme maladie par une étude de l'accès palustre lors d'épidémies, dans les cas de paludisme grave, et dans deux populations à risque : femmes enceintes et jeunes enfants. De plus, un travail sur des séquences microsatellites permet théoriquement de suivre les flux géniques entre populations de parasites. C'est dans ce cadre d'étude génétique des parasites que le stage effectué trouve sa place,
- et un suivi de l'apparition et de la dissémination des résistances par la mise en place du Réseau d'Etude de la Résistance au niveau national et régional.

Un premier travail bibliographique m'a permis de réunir l'ensemble des études portant sur les endoparasites (Protozoaires et Helminthes) d'oiseaux de Madagascar. Ce travail fait l'objet d'un article de revue générale qui fut accepté comme chapitre du livre de Goodman SM.: *Natural History of Madagascar* (Annexe 1).

♦ L'avifaune de Madagascar

Madagascar est la quatrième plus grande île du monde et a été isolée depuis au moins 120 millions d'années. Un nombre élevé de taxons du règne animal et végétal prouvent ce long passé d'isolement (Langrand O., 1995). Cette situation a pour résultat de pouvoir offrir la possibilité d'étudier in situ des communautés biologiques qui ont disparu de la masse continentale et inversement d'autres communautés biologiques semblent être absentes de l'île comme certains agents pathogènes responsables de pandémies humaines (dengue, fièvre jaune) ou animales (fièvre aphteuse).

Cet isolement géographique a des conséquences sur certaines particularités de l'avifaune de Madagascar. La première caractéristique est sa pauvreté relative en nombre d'espèces non seulement par rapport à un peuplement avien continental à latitude équivalente mais aussi par rapport aux peuplements aviens d'autres îles de l'Océan Indien comme Bornéo ou la Nouvelle-Guinée. La deuxième caractéristique est constituée par le niveau d'endémisme très élevé : 52,2 % des espèces d'oiseaux sont endémiques de Madagascar, toutes presque exclusivement forestières. Cette fréquence est considérable en comparaison du reste du monde (Langrand O., 1995). De plus, les migrations intercontinentales concernent peu d'espèces endémiques. Seulement quatre espèces nicheuses malgaches migrent vers l'Afrique orientale. Inversement, une seule espèce nicheuse d'Afrique, des migrateurs paléarctiques (la plupart des Charadriiformes ainsi que deux Falconiformes) hivernent à Madagascar.

Dans ce contexte de fort endémisme et de migrations modérées, a priori favorable à un isolement des oiseaux, on pourrait s'attendre à des particularités de la population parasitaire aviaire et un endémisme élevé parmi les parasites.

♦ **Hématozoaires aviaires : *Haemoproteus*, *Plasmodium* et *Leucocytozoon***

Parmi les sept phylums constituant l'embranchement des Protozoaires, deux (Phylums Apicomplexa et Sarcomastigophora) contiennent des parasites sanguins d'oiseaux (Reid MW., 1991) (Tableau 1).

De nombreuses études sur les hématozoaires aviaires ont permis de faire un inventaire sur les parasites et leurs hôtes dans différentes régions du monde. Les genres les plus fréquemment rencontrés sont : *Haemoproteus*, *Plasmodium* et *Leucocytozoon*, pour les coccidies et *Trypanosoma* pour les flagellés. Les piroplasmes (*Babesia* et *Aegyptianella*) sont moins usuels.

<u>Phylum Apicomplexa</u>
Class Sporozoea
Subclass Coccidia
Order Eucoccidiida
Suborder Adeleina: <i>Hepatozoon</i> , <i>Haemogregarina</i>
Suborder Eimeriina (aussi appelés Coccidies):
<i>Toxoplasma</i> , <i>Cryptosporidium</i> , <i>Eimeria</i> , <i>Isospora</i> , <i>Sarcocystis</i>
Suborder Haemosporina, (appelés "Malaria parasites")
<i>Haemoproteus</i>, <i>Plasmodium</i>, <i>Leucocytozoon</i>.
Subclass Piroplasmia:
Order Piroplasmida: <i>Babesia</i>, <i>Theileria</i>, <i>Aegyptianella</i>.
<u>Phylum Sarcomastigophora</u>
Subphylum Mastigophora
Class Zoomastigophorea
Order Kinetoplastida : <i>Trypanosoma</i>, <i>Leishmania</i>
Order Retortamonadida : <i>Chilomastix</i>
Order Diplomonadida : <i>Hexamita</i>
Order Trichomodida : <i>Trichomonas</i> , <i>Histomonas</i>
Phylum Ciliophora
Phylum Microspora
Phylum Ascetospora
Phylum Myxospora
Phylum Labyrinthomorpha

Tableau 1. Positionnement des principaux hématozoaires aviaires (indiqués en caractères gras) au sein de la classification des Protozoaires.

(D'après Levine ND *et al.*, 1980)

Il existe peu d'études sur ce sujet à Madagascar. Les deux travaux reportés dans la littérature mettent en évidence les mêmes genres que cités précédemment avec une parasitémie de faible intensité : environ un parasite pour 10 000 globules rouges et une prévalence de 14 oiseaux infectés sur 64 et 6/10 (Bennett GF. *et al.*, 1974 ; Greiner EC. *et al.*, 1996).

Nous nous intéresserons ici plus particulièrement aux genres *Haemoproteus*, *Plasmodium* et *Leucocytozoon*, communément désignés sous le terme anglophone de « Malaria parasites ».

Le paludisme aviaire du au genre *Plasmodium* a été mis en évidence sur tous les continents (Garnham PCC., 1966). Parmi les 65 espèces de *Plasmodium* décrites chez les oiseaux, 35 ou moins peuvent être considérés comme valables (Springer WT., 1991). L'arthropode vecteur est, chez les oiseaux, un Culiciné (*Culex* et *Aedes* notamment) alors que c'est un Anophéliné chez les mammifères (dans les deux cas, ce sont des vecteurs de la famille des Culicidés). L'infection chez les oiseaux se caractérise par la présence de pigments dans les globules rouges, par une schizogonie exo et endo-érythrocytaire et par une gamétogonie endo-érythrocytaire (Figure 7). Le sang périphérique contient donc des schizontes et des gamétocytes à la différence des autres membres du sous ordre des Haemosporina (*Haemoproteus* et *Leucocytozoon*) (Figures 1 et 2). La pathogénie, rapportée chez les oiseaux domestiques, est très variable allant de l'infection inapparente à l'anémie sévère. *Plasmodium gallinaceum*, *P. juxtannucleare*, *P. durae* et *P. relictum* (Atkinson CT. et al., 1993) sont les plus pathogènes et peuvent provoquer au sein des élevages jusqu'à 90 % de mortalité (Springer WT., 1991). *Plasmodium relictum* est notamment responsable du déclin d'espèces forestières endémiques à Hawaï particulièrement sensibles au parasite (Atkinson CT. et al.; 1993 ; Youth H., 1995). La détermination d'espèces de *Plasmodium* est très souvent délicate. Elle l'est d'autant plus que la plupart des espèces de ce genre sont peu spécifiques et ont un spectre d'hôte large. Malgré tout, on a pu constaté une plus grande concentration chez les Passériformes, une moindre fréquence chez les Galliformes et une complète absence chez les perruches (Garnham PCC., 1966).

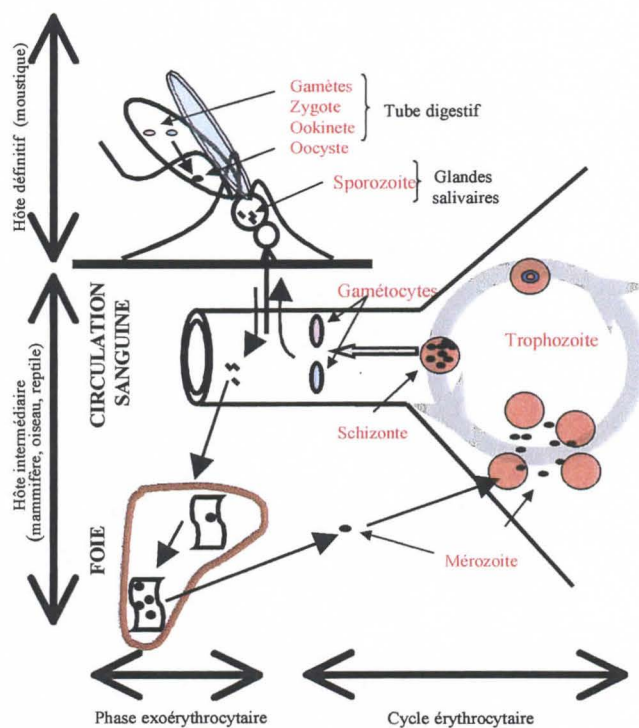


Figure 7. Cycle parasitaire du *Plasmodium*.

(D'après site internet de l'Institut Pasteur de Madagascar

<http://www.pasteur.mg/images/cyclpal.gif>)

Les infections à *Haemoproteus* se caractérisent par une schizogonie qui n'a lieu que dans les cellules endothéliales viscérales et par la présence de gamétocytes pigmentés dans le sang circulant (Figure 3). Des 133 espèces d'*Haemoproteus*, 114 concernent des oiseaux, 16 des reptiles et trois des amphibiens. La transmission est assurée par des diptères Hippoboscides et Cératopogonides. A Madagascar, Bennett GF. et Blancou J. (1974) ne mirent en évidence aucune infection à *Haemoproteus* dans le sang des 64 oiseaux étudiés et ils considérèrent ce point comme particulièrement surprenant sachant que ce genre est considéré comme le principal hématozoaire aviaire en Afrique (Bennett GF. *et al.*, 1992). De plus, d'autres études notèrent également le caractère commun d'*Haemoproteus* (Brygoo ER., 1963 ; Greiner EC. *et al.*, 1996). Il est à noter la spécificité d'hôte étroite : la connaissance de la famille de l'oiseau hôte facilite le diagnostic d'espèces. La distinction avec le genre *Plasmodium* est souvent difficile quand l'observation du frottis sanguin ne met en évidence que des gamétocytes.

Les infections à *Leucocytozoon* se caractérisent aussi par la présence de gamétocytes circulant mais à la différence d'*Haemoproteus*, ces gamétocytes sont non pigmentés et dans des GR ou leucocytes déformés, morphologiquement bien différents des deux précédents genres (Figure 4). La transmission est assurée par des mouches Simuliides et des Cératopogonides. Environ 67 espèces ont été décrites dans le monde entier toutes chez des oiseaux à la différence d'une seule espèce chez un lézard au Brésil. La spécificité d'hôte étant également étroite, le diagnostic d'espèces est orienté par la connaissance de l'hôte (Springer WT., 1991 ; Hsu CK. *et al.*, 1973).

RECOLTE DES PRELEVEMENTS

Durant la période de stage, une mission d'une semaine en forêt humide, en collaboration avec le WWF, a permis d'assurer la capture et le prélèvement sanguin de 77 oiseaux, tous pour la plupart endémiques. La collaboration avec le WWF était particulièrement précieuse notamment dans le choix du site de capture mais aussi pour les connaissances ornithologiques (identification des espèces). L'équipe se composait donc d'une ornithologue du WWF, d'un médecin de L'IPM spécialisée dans la lecture de frottis sanguins et de moi-même, vétérinaire.

◆ Site de capture

Le choix du site de capture devait répondre à certaines exigences. D'une part, l'accessibilité : Madagascar présente une surface importante (587 000 km²) et le réseau routier est peu développé avec des routes généralement en mauvais état. La durée de la mission n'étant prévue que d'une semaine, le transport ne pouvait pas prendre plusieurs jours, comme c'est le plus souvent le cas à Madagascar. D'autre part, l'endroit devait être un site non protégé permettant d'obtenir les autorisations ministérielles pour les captures et prélèvements d'oiseaux. Le site choisi se trouvait donc sur la route d'Anjozorobe au nord de Tana à trois heures de route et piste près du village d'Andranomay (Carte 1). Une heure et demi de marche en forêt était nécessaire pour atteindre le campement à 1300 mètres d'altitude (Annexe 2). La lecture des frottis sanguins se faisant sur place, il fut nécessaire d'emmener le microscope, le groupe électrogène ainsi que le matériel de coloration des lames.

La capture des oiseaux et l'identification des espèces étaient assurées par l'ornithologue du WWF. Douze filets furent mis en place, une relève environ toutes les heures permettait de récupérer les oiseaux.



Carte 1. Localisation du site de capture.

◆ Prélèvements

Mon principal rôle était d'assurer les prélèvements des oiseaux et je participais également à la lecture des lames. Le prélèvement était pratiqué à la veine jugulaire droite avec seringue à insuline puis transféré dans des tubes Nunc contenant 0,9 ml de diluant* afin d'augmenter le volume de sang prélevé. Le maximum prélevé était de l'ordre de 0,1 ml et en moyenne 0,05 ml. Cependant, la taille de certains oiseaux capturés ne permettait pas toujours ce type de prélèvement, quelques gouttes de sang étaient alors récupérées en coupant une griffe. Dans les deux cas, un frottis sanguin était pratiqué et immédiatement coloré, le reste du sang conservé dans l'azote liquide.

La recherche d'hématozoaires aviaires sur frottis sanguins se faisait également sur place : 10 à 15 minutes était en moyenne consacré par lame. Si le résultat s'avérait positif, l'oiseau qui était maintenu dans un pochon, était sacrifié et les organes (foie, rate, cœur, cerveau) étaient prélevés en vue d'appositions sur lames puis de congélation dans l'azote liquide.

*Composition du diluant : 1x M-199 sels Hanks, Tris 0,05 M pH 7,6, BSA 1%, Bicarbonate de soude 0,35 g/l, Penicilline 100 U/ml, Streptomycine 100 µg/ml, Amphotéricine B 1 µl/ml.

◆ Résultats (Annexe 3)

Soixante dix sept oiseaux forestiers au total furent capturés avec une moyenne de 13 oiseaux par jour. Dix sept espèces différentes étaient représentées, toutes endémiques de Madagascar. Aucune espèce migratrice ne fut répertoriée. L'espèce majoritaire (20/77) correspondait à un passériforme : le Bulbul zosterops (*Phyllastrephus zosterops*). Le pourcentage de mortalité fut important : 32/77 (41%), mortalité en partie due au prélèvement lui-même mais aussi à la durée dans le pochon.

Les résultats microscopiques (Annexe 3) montrent cinq infections à *Plasmodium* ou *Haemoproteus* (Figure 3), deux infections à *Leucocytozoon* (Figure 4), deux également à *Trypanosoma* (Figure 5) et six à microfilaires (Figure 6). Au total, 11 oiseaux sur 77 (14%) ont eu une recherche positive Hématozoaires aviaires. Des coinfections concernent trois d'entre eux : *Plasmodium* ou *Haemoproteus* / Microfilaires (n°31), *Haemoproteus* / *Leucocytozoon* / Microfilaires (n° 40), *Trypanosoma* / Microfilaires (n° 33).

Les images des frottis positifs m'ont permis de participer à l'élaboration d'un CD regroupant également des images d'hématozoaires d'oiseaux prélevés à Madagascar en 1996, ainsi que de RCA en 2001. L'identification des espèces étant comme on l'a vu délicate, le choix a été fait d'adresser, au mois d'août 2001, ce CD au Centre International de Référence pour les Hématozoaires aviaires à Brisbane en Australie*. Les résultats ne sont pas encore disponibles.

*International Reference Center for Avian Haematozoa (IRCAH) – Queensland Museum, PO Box 3300, South Brisbane, Queensland 4101 Australia.

◆ Discussion

Le choix du site de capture mérite quelques commentaires. Tout d'abord, l'altitude (1300m) et la saison de capture (saison froide en moyenne 11 ° C le matin) n'étaient pas propices à un fort niveau de transmission par la rareté des vecteurs. L'influence d'une autre période de capture ainsi qu'un autre biotope plus chaud comme la côte ouest sur la prévalence de l'infection serait intéressante.

Concernant la mortalité des oiseaux, nous avons pu constater un fort pourcentage sur les oiseaux capturés le soir, qui étaient restés dans le pochon toute la nuit. Pour les prochaines missions, ce pourcentage pourra être nettement amélioré notamment avec l'habitude du préleveur mais aussi en relâchant les oiseaux du soir avant le coucher du soleil.

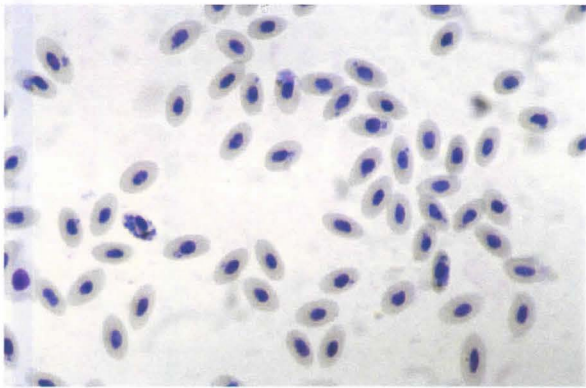


Figure 1. *Plasmodium gallinaceum*.
Trophozoïtes et Schizontes. IPP (fév. 01)

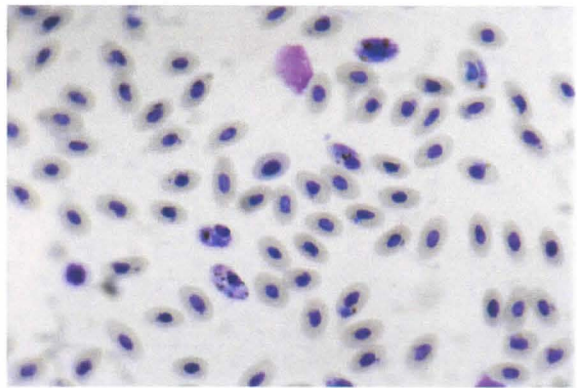


Figure 2. *Plasmodium gallinaceum*.
Trophozoïtes, Schizontes et gamétocytes. IPP (fév. 01)

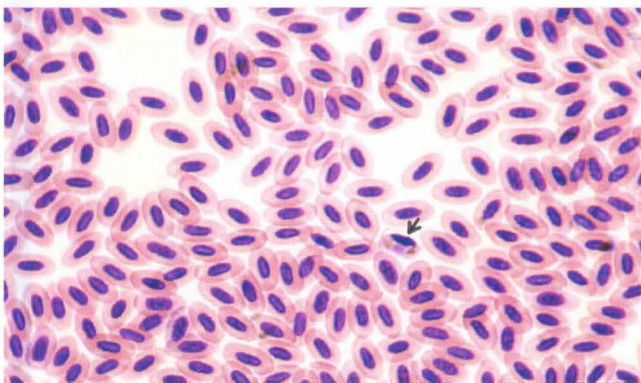


Figure 3. *Haemoproteus* sp. Mission (juin 01)

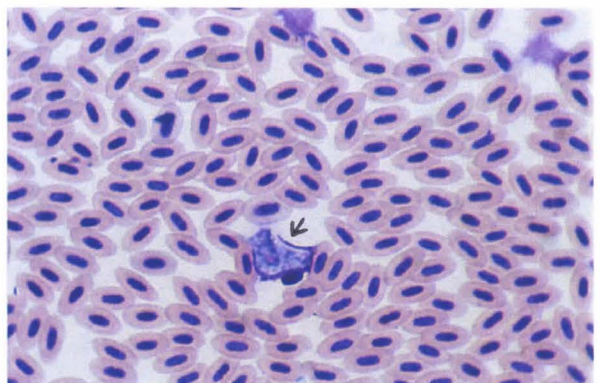


Figure 4. *Leucocytozoon* sp. Mission (juin 01)



Figure 5. *Microfilaria*. Mission (juin 01)

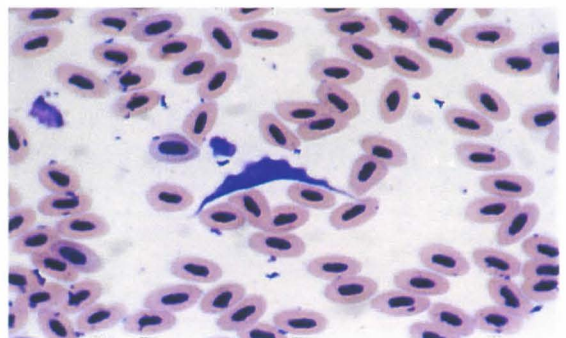


Figure 6. *Trypanosoma* sp. Mission (juin 01)

♦ **Phylogénie du genre *Plasmodium*. Positionnement de *P. falciparum*.**

P. falciparum, *P. vivax* et *P. ovale* sont considérés comme les seules espèces spécifiques de l'homme. *P. malariae* est en fait commune à l'homme et à certains singes africains et montre de très grandes similitudes avec *P. brasilianum*, un parasite de singes d'Amérique du sud (Lal AA. *et al.*, 1988). Il existe donc des grandes similitudes biologiques et/ou génétiques entre les quatre espèces parasites de l'homme et des espèces simiennes: *P. falciparum* avec *P. reichenowi*, *P. malariae* avec *P. brasilianum* et *P. ovale* avec *P. simiovale* et *P. vivax* avec plusieurs espèces simiennes dont *P. cynomolgi*, *P. fragile*, *P. gonderi* et *P. simium* (Coatney GR. *et al.*, 1971).

Contrairement aux autres espèces de *Plasmodium* humains ou simiens, le génome de *P. falciparum* comme celui des *Plasmodium* aviaires, est très riche en AT, avec une moyenne de GC de 18%. Cette première similitude alimente l'hypothèse que *P. falciparum* a été introduit chez l'homme à la suite d'un transfert latéral (Coppel RL *et al.*, 1998). Les résultats des analyses du gène SSU rRNA et du cytochrome B indiquent que *P. falciparum* a des origines très différentes des autres espèces de *Plasmodium* de l'homme (Waters AP. *et al.*, 1991; Waters AP. *et al.*, 1993, Escalante AA. *et al.*, 1998) (Figure 8). De fait, il est phylogénétiquement plus proche des espèces aviaires avec qui il partagerait donc un ancêtre commun récent. Ce rapprochement phylogénétique avait déjà été proposé sur la base de similitudes morphologiques entre *P. falciparum* et des *Plasmodium* d'oiseaux (Landau I. *et al.*, 1976).

P. reichenowi, parasite de chimpanzé au Gabon et dans les pays voisins, demeure l'espèce la plus proche de *P. falciparum*, aussi bien au niveau génétique (Lal AA. *et al.*, 1991; Lal AA. *et al.*, 1993; Moelans *et al.*, 1992) qu'au niveau de sa morphologie et de son développement (Coatney *et al.*, 1971). On n'a jamais réussi à infecter des espèces d'*Anopheles* par des gamétocytes de *P. reichenowi* et il est probable que le vecteur naturel fasse partie de la sous-famille des Culiciné et non des Anophelinés. Or comme nous l'avons vu précédemment, les vecteurs naturels des *Plasmodium* d'oiseaux semblent être des Culiciné (peut être s'agit-il d'une espèce d'*Aedes*). Compte tenu du grand nombre d'espèces aviaires et de la position unique de *P. falciparum* et de *P. reichenowi* parmi les espèces parasitant les mammifères (Garnham PCC, 1966), il a été proposé que l'introduction de *P. falciparum* chez l'homme et le chimpanzé provienne d'un transfert latéral. Ce transfert coïnciderait avec l'apparition de nouvelles habitudes humaines agricoles ayant augmenté les probabilités de rencontre avec de nouveaux parasites. Cette arrivée récente de *P. falciparum* chez l'homme expliquerait sa plus grande virulence même si l'association entre virulence et ancienneté de l'interaction hôte-parasite est souvent remise en cause (Escalante AA. *et al.*, 1998).

Cependant les études phylogénétiques donnent comme date présumée de divergence entre *P. falciparum* et les espèces spécifiques d'oiseaux un ordre de grandeur d'au moins quelques dizaine de millions d'années, ce qui est difficilement compatible avec un transfert latéral d'une espèce aviaire à une population humaine (Escalante *et al*, 1994 ; Ayala *et al.*, 1992).

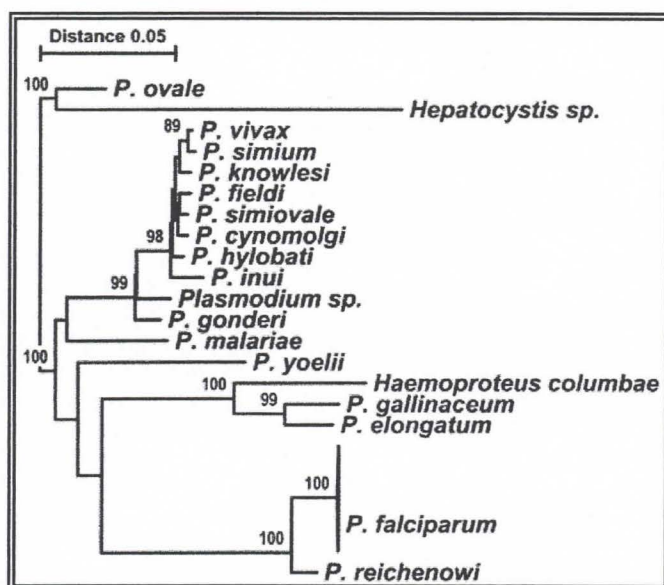


Figure 8. Exemple d'arbre phylogénique basé sur l'analyse du gène codant pour le cytochrome B (méthode neighbor joining). D'après Escalante AA. *et al.*, 1998.

♦ Choix des séquences et des amorces

Recherche de séquences d'intérêt phylogénique

Une première recherche des séquences actuellement disponibles dans les bases de données (genbank et embl ; site infobiogen / SRS : <http://www.infobiogen.fr/srs/>) a permis de définir les régions du génome de *Plasmodium* et autres hématozoaires aviaires les plus séquencées. Le génome parasite s'organisant en ADN chromosomique et extra- chromosomique : (ADN mitochondrial et chloroplastique), trois régions ont été ciblées : région codant pour l'ARNr 18S / ADN nucléaire, Cytochrome b / ADN mitochondrial et Clpc / ADN chloroplastique.

Le choix des séquences d'intérêt phylogénique repose aussi le taux de mutation : chaque séquence accumule les mutations à un rythme qui lui est propre. L'accumulation sera maximale pour des régions qui ne sont pas soumises à la pression de sélection naturelle (non codantes) et minimale dans les parties du génome soumises à une forte pression (c'est-à-dire des régions codant pour des fonctions essentielles à la survie de l'organisme). C'est le cas du Cytochrome b intervenant dans les chaînes d'oxydation cellulaire de tous les êtres vivants. Si l'on admet cette théorie de l'Horloge

moléculaire, et que l'on connaît le taux d'accumulation des mutations, il est possible d'estimer le temps de divergence d'espèces en comparant leur diversité moléculaire. Cependant, cette théorie est remise en cause par le fait que les mutations ne seraient pas constantes dans le temps. Malgré tout, il semblerait que l'horloge moléculaire soit valable pour de longues périodes évolutives, pour des gènes ayant un taux de mutation faible (infobiogen).

Alignement des séquences

Pour chacune des trois régions, les séquences récupérées dans les bases de données ont été alignées à l'aide du logiciel Multalin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) afin d'identifier les parties du génome particulièrement conservées entre les différentes espèces de *Plasmodium* et autres hématozoaires. Quand cela était possible, ces alignements étaient comparés à la séquence du même gène chez l'oiseau. Un exemple d'alignement concernant le cytochrome *b* est donné en annexe 4.

Choix des amorces

Le choix des primers s'est effectué dans les régions conservées du génome. Le but était d'encadrer un fragment de gènes suffisamment grand (environ 500 pb). Les amorces devaient être d'une longueur suffisante environ 20 pb, ne pas être répétées au niveau des séquences de gènes aviaires afin d'éviter toute amplification parasite et être suffisamment riche en GC surtout au niveau de l'extrémité 5'. L'utilisation du logiciel Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>) permettait de connaître la liste des séquences hybridant avec ces amorces et notamment de vérifier quel type de génome elles étaient capables d'amplifier. Ainsi, trois couples d'amorces correspondant aux trois différentes régions ciblées ont été choisis et commandés :

- ARNr 18s : RPLU6 : 5'-TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG-3'
RPLU5 : 5'-CCTGTTGTTGCCTTAACTTC-3'

La taille attendue du fragment amplifié est environ de 1000 nucléotides.

- Cytochrome *b* : HAEMF : 5'-TGGTGTTTIGATAAATGCAYGC-3'
HAEMR2 : 5'-GCATTATCIGGATGTGATAATGGT-3'

Taille attendue de 478 nucléotides. Y= C ou T / i=inosine (A, T, G ou C)

Ces amorces ont été choisies en référence à l'article de Bensch S. *et al.* (2000).

- Chloroplaste : ClpC 1421 : 5'-AAAAGTGAATTAGCAAAAATATTA-3'
ClpC 1423 : 5'-CGAGCTCCATATAAAGGAT-3'

Taille attendue environ 597 nucléotides.

♦ Mise au point des réactions PCR

Pour les trois couples d'amorces choisis, mon rôle fut de définir les conditions PCR idéales pour une amplification des ADN parasites autorisant par la suite un séquençage.

Dans un premier temps, les prélèvements de sang sont centrifugés afin de récupérer le culot cellulaire ; l'extraction d'ADN se fait selon la méthode phénol-chloroforme, les extraits d'ADN sont repris dans 100 µl. Trois prélèvements d'oiseaux positifs ont été extraits : n°12 (infection à *Haemoproteus*), n° 31 (*Haemoproteus* et microfilaires) et n° 40 (*Haemoproteus* / *Leucocytozoon* / Microfilaires).

Plusieurs facteurs peuvent être modifiés afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité de la méthode PCR : la température d'hybridation, la concentration finale en MgCl₂, le nombre de cycles et la dilution des ADN. Les globules rouges des oiseaux étant nucléés, les extraits étaient très riches en ADN d'où un smear fréquemment observé. La dilution des ADN mais aussi l'augmentation de la température d'hybridation et/ou la diminution du nombre de cycles contribuaient à diminuer ce smear gênant pour le séquençage. Un gradient de température a été effectué afin de déterminer la température d'hybridation idéale pour chaque couple d'amorce. Aucune influence de la concentration en Mgcl₂ ne fut notée.

Quelque soit la PCR considérée, les concentrations finales dans le mélange réactionnel sont les suivantes : 1 µM de chaque amorce, 200 µM pour les dNTPs, 2 unités de Taq polymérase. Le volume final du mélange est de 49 µl auquel est ajouté 1 µl d'ADN. La visualisation des produits d'amplification est réalisée sur un gel d'agarose à 2% : 15 µl est déposé dans chaque puits. Les conditions d'amplification pour chaque couple d'amorces sont les suivantes : dénaturation : 30 s à 94°C, hybridation : 30 s à 62°C (amorces RPLU) ; 55°C (amorces HAE) et 58°C (amorces ClpC), élongation 1 min 30 à 72°C. suivi de 10 min à 72°C. Trente cinq cycles sont effectués pour les PCR cytochrome b et ClpC, 30 cycles pour la PCR ARNr.

Les résultats montrent une amplification à la taille attendue pour les oiseaux 40 et 12 et pour les souches humaines pour les trois couples d'amorces (Figures 9, 10 et 11). L'oiseau 31 ne présente qu'une bande nette différente de la taille attendue avec le couple d'amorce ClpC et rien avec les deux autres couples d'amorces. Autre remarque concernant ces résultats : certaines souches de *Plasmodium* humains restent négatives avec les couples d'amorces utilisés, ceci pouvant s'expliquer par une mauvaise reproductibilité de la méthode ou une dégradation des extraits d'ADN.

Les bandes les plus nettes ont été choisies pour envoi pour séquençage (Genome express). 28 amplicons d'un volume de 15 µl au total ont été envoyés pour séquençage à partir des deux extrémités d'où un total de 59 séquences.

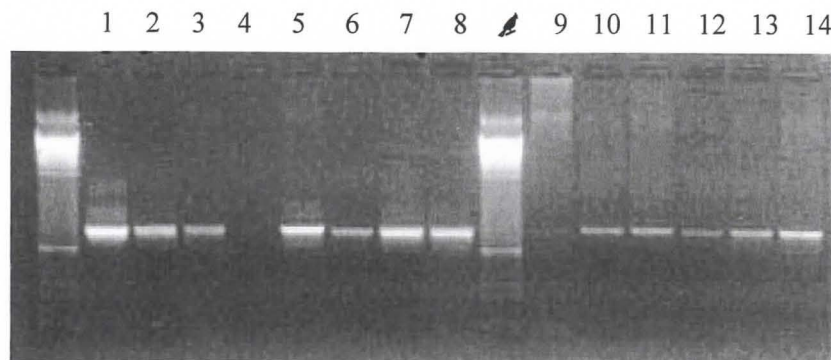


Figure 9. Gel d'électrophorèse, résultat de la PCR ARNr 18s.

Les colonnes de 1 à 8 concernent des ADN de *Plasmodium* humains et de 9 à 14 des ADN extraits de sang d'oiseaux positifs en hématozoaires à la lecture du frottis. *P. falciparum* : colonnes 1 et 2. *P. vivax* : colonnes 3, 4, 7 et 8. *P. malariae*: colonnes 5 et 6. Les colonnes 9, 10 et 11 concernent l'ADN extrait du sang de l'oiseau n°12 à différentes dilutions (1/8, 1/16, 1/32) et les colonnes de 12 à 14, l'oiseau n° 40 avec les mêmes dilutions.

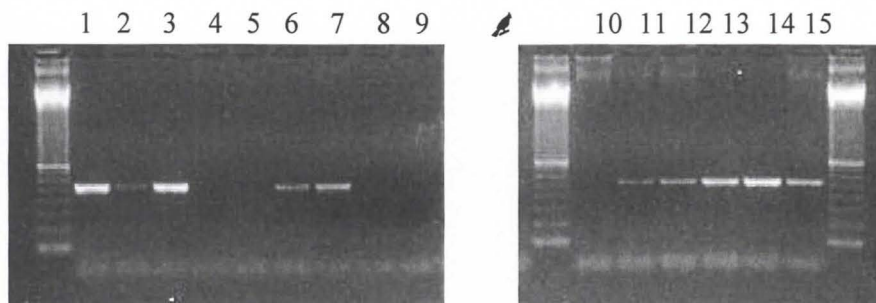


Figure 10. Gel d'électrophorèse, résultat de la PCR Cytochrome b.

Les colonnes de 1 à 9 concernent des ADN de *Plasmodium* humains et de 12 à 17 des ADN extraits de sang d'oiseaux positifs en hématozoaires à la lecture du frottis. *P. falciparum* : colonnes 1, 2, 3. *P. vivax* : colonnes 8, 9 et 5. *P. malariae*: colonnes 6 et 7. *P. ovale* : colonne 4. Les colonnes 10, 11 et 12 concernent l'ADN extrait du sang de l'oiseau n°12 à différentes dilutions (1/8, 1/16, 1/32) et les colonnes de 13 à 15, l'oiseau n° 40 avec les mêmes dilutions.

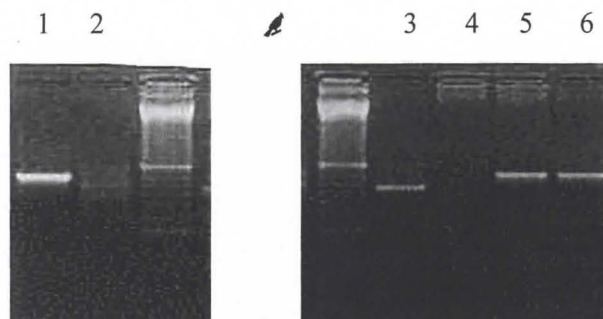


Figure 10. Gel d'électrophorèse, résultat de la PCR ClpC.

Les colonnes 1 et 2 concernent des ADN de *Plasmodium* humains et de 3 à 6 des ADN extraits de sang d'oiseaux positifs en hématozoaires à la lecture du frottis. *P. falciparum* : colonne 1. *P. malariae*: colonne 2. Les colonnes 5 et 6 concernent l'ADN extrait du sang de l'oiseau n°40 à différentes dilutions (1/32, 1/80), la colonne 3, l'oiseau n° 31 et la colonne n° 4, l'oiseau n° 12.

♦ Analyse phylogénique : Construction d'un arbre

Une fois les séquences recues, celles ci devront être alignées et comparées entre elles. Il existe deux grands types de méthodes permettant la construction d'arbres phylogéniques succinctement évoquées ici :

- les méthodes basées sur les mesures de distances entre les séquences prises deux à deux. Ce sont des méthodes de construction d'arbre sans racine basée sur la recherche d'OTU (Operational Taxonomic Units, le plus souvent équivalent à une séquence) les plus proches et ceci à chaque étape de regroupement. Ces méthodes sont rapides et donnent de bons résultats pour des séquences ayant une forte similarité mais elles ne font pas de distinction entre homologie, similitude par filiation et homoplasie, similitude qui n'est pas la conséquence d'un héritage commun mais provient de l'acquisition d'un même état du caractère, dans les deux lignées de façon indépendante (Solignac M. *et al.*, 1995). Parmi ces méthodes, une des plus utilisée est la méthode Neighbor joining développée par Saitou et Nei (1987).
- les méthodes basées sur les caractères qui s'intéressent au nombre de mutations qui affectent chacun des sites de la séquence (parcimonie, maximum de vraisemblance). Ces méthodes sont beaucoup plus précises que les précédentes mais plus lentes et inutilisables pour un grand nombre de séquences. La parcimonie consiste à minimiser le nombre de « pas » (mutations/substitutions) nécessaires pour passer d'une séquence à une autre. Différentes topologies sont ainsi évaluées afin de trouver l'arbre optimal. Un des avantages de cette méthode est qu'elle tente de donner une information sur les séquences ancestrales (caractères plésiomorphes). Le maximum de vraisemblance est une méthode qui évalue en terme de probabilité, l'ordre des branchements et la longueur des branches d'un arbre sous un modèle évolutif donné.

L'annexe 5 fournit un exemple de chromatogramme reçu suite au séquençage des 59 séquences. Il y a un code couleur pour chaque nucléotide, des pics bien individualisés montrent une identification correcte des bases. Quand ce n'était pas le cas, la lettre N a été utilisée. Concernant le cytochrome b, l'alignement des séquences reçues entre elles montre un fort pourcentage d'homologie. L'interprétation de toutes les séquences reçues sera effectuée dans un deuxième temps, la durée du stage ne le permettant pas.

CONCLUSION

Cette étude a contribué à une meilleure connaissance des hématozoaires aviaires endémiques de Madagascar, peu d'études ayant été jusqu'à maintenant menées. La présence de certains hématozoaires a donc été confirmée.

De plus, j'ai pu grâce à cette étude travailler dans une équipe pluridisciplinaire comprenant des médecins chercheurs, entomologistes, ornithologistes, expérience très enrichissante permettant de mettre en avant la complémentarité des compétences de chacun. Ceci a permis de souligner toute l'importance des compétences vétérinaires dans le cadre d'étude de maladies émergentes et de veille microbiologique.

Ce stage m'a également permis de me familiariser avec les étapes de construction d'un arbre phylogénique et de me montrer tout l'intérêt de la phylogénie moléculaire dans l'histoire évolutive d'agents pathogènes et notamment d'agents responsables de maladies émergentes. La durée du stage n'étant que de 4 mois, l'analyse phylogénique complète des séquences reçues n'a pu se faire mais ce travail n'est que le début d'une plus longue étude concernant la phylogénie des plasmodies endémiques de Madagascar chez plusieurs espèces hôtes : lémuriens oiseaux, reptiles.

BIBLIOGRAPHIE

1. Atkinson C.T., Dusek R.J. and W.M. Iko. 1993. Epidemic pox and malaria in native forest birds. *Hawaii's Forests and Wildlife* 8(3): 10
2. Ayala FJ., Fitch WM. 1992. Phylogeny of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today*, 8, 74-75.
3. Bennett G.F. and Blancou J. 1974. A note of the blood parasites of some birds from the Republic of Madagascar. *Journal of Wildlife Disease* 10: 239-240.
4. Bennett G.F., Earlé R.A., Du Toit H. and Huchzermeyer F.W. 1992. A host-parasite catalogue of the haematozoa of the sub-Saharan birds. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 59: 1-73.
5. Bensch S., Stjernman M., Hasselquist D., Ostman O., Hansson B., Westerdahl H. and Pinheiro RT. 2000. Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 267, 1583-1589.
6. Brygoo E.R. 1963. Contribution à la connaissance de la parasitologie des caméléons malgaches. Thèse de Sciences naturelles de l'Université de Paris, Série A, N° 4107, N° d'ordre 4958.
7. Coatney GR. 1971. The simian malarias : zoonoses, anthroponoses, or both ? *Am J Trop Med Hyg*, 20, 795-803.
8. Coppel RL. And Casilda GB. 1998. Chapter 13: Malaria parasite DNA 185-202. In *Malaria : Parasite, Biology, Pathogenesis and Protection*. Edited by Irwin W. Sherman. ASM Press, Washington, D.C. 575 pp.
9. Escalante AA and Ayala FJ. 1994. Phylogeny of the genus *Plasmodium*, derived from rRNA gene sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 11373-11377.
10. Escalante AA, Freeland DE., Collins WE., Lal AA. 1998. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. *PNAS*, 95, 8124-8129.
11. Garnham P.C.C. 1966. *Malaria parasites and other Haemosporidia*, p.1114. Oxford: Blackwell scientific Publications.
12. Greiner E.C., Putnam M.S. and Goodman S.M. 1996. Blood parasites from birds in the Réserve Naturelle Intégrale d'Andringitra, Madagascar. In *A floral and faunal inventory of the eastern slopes of the Réserve Naturelle Intégrale d'Andringitra, Madagascar: with reference to elevational variation*, ed. S.M. Goodman. *Fieldiana: Zoology*, new series, 85: 142-143.
13. Hsu C.K., Campbell G.R. and Levine N.D. 1973. A checklist of the species of the genus *Leucocytozoon* (Apicomplexa, Plasmodiidae). *Journal of Protozoology* 20: 195-203.

14. Lal AA, de la Cruz VF., Collins WE., Campbell GH., Procell PM. and Mc Cutchan TF. 1988. Circumsporozoite protein gene from *Plasmodium brasilianum*. Animal reservoirs for human malaria parasites?. *J. Biol. Chem*, 263 (12), 5495-8.
15. Lal AA., Goldman IF. 1991. Circumsporozoite protein gene from *Plasmodium reichenowi*, a chimpanzee malaria parasite evolutionarily related to the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. boil. Chem.*, 266, 6686-6689.
16. Lal AA. Goldman IF., Collins WE. And Kumar N. 1993. Sequence of a 27-kilodalton gamete antigen of *Plasmodium reichenowi* and comparison with Pfg27 of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 59, 175-176.
17. Landau I, Miltgen F., Chabaud AG. Different types of gametocytes in mammal's Haemosporidia. 1976. Correlations with the morphology of the tissue schizonts. Hypothesis on the evolution of the group. *Ann Parasitol Hum Comp*, 51, 175-87.
18. Langrand O. 1995. Guide des oiseaux de Madagascar. pp. 415. Lausanne : Delachaux et Niestlé.
19. Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.E., Deroux G., Grain J., Honigberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R., Lom J., Lynn D., Merinfeld E.G., Page F.C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J. and Wallace F.G. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *Journal of Protozoology* 27: 37-58.
20. Reid M.W. 1991. Protozoa, Introduction. In *Diseases of Poultry*. Ninth edition, ed. B.W. Calnek, p. 779. London: Wolf Publishing Ltd.
21. Saitou N. and Nei M. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. 1987. *Mol. Biol. Evol.* 4 (4), 406-425.
22. Solignac M., Periquet G., Anxolabéhère D. et Petit C. 1995. Phylogénies et classifications. In *Génétique et évolution*, Tome II. Hermann, éditeurs des sciences et des arts, p. 301.
23. Springer W.T. 1991. Other blood and tissue Protozoa. In *Diseases of poultry*, ninth edition, ed. B.W. Calnek, pp. 814-826. London: Wolf Publishing Ltd.
24. Waters AP, Higgins DG, Mc Cutchan TF. 1991. *Plasmodium falciparum* appears to have arisen as a result of a lateral transfer between avian and human hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, 3140-3144.
25. Waters AP., Higgins DG., McCutchan TF. 1993. Evolutionary relatedness of some Primate models of *Plasmodium*. *Mol. Biol. Evol.* 10, 914-923.
26. Youth H. 1995. Hawaii's Forest Birds Sing the Blues. Site internet Zoogoer : <http://www.fonz.org/zoogoer/zg1995/honeycreepers.htm>.

ANNEXE 1. ARTICLE DE REVUE GENERALE
ENDOPARASITES OF MALAGASY BIRDS

Revised version of June 6, 2001
Including SMG's and JPB's comments
Text in bold characters must be completed
Accepted for publication

ENDOPARASITES OF MALAGASY BIRDS

Hélène L. Sadonès*, Frédéric Arieu *, Steven M. Goodman#, Jean-Bernard Duchemin*,
Vincent Robert*†

*Groupe de Recherche sur le Paludisme, Institut Pasteur de Madagascar, B.P.1274

Antananarivo 101, Madagascar, fax : 261 20 22 415 34, email : arieu@pasteur.mg

World Wide Fund for Nature, Antananarivo and Field Museum of Natural History, Chicago,
USA, email goodman@wwf.mg

† Institut de Recherche pour le Développement, email : robert@pasteur.mg

In Madagascar, the study of bird parasitism is inseparable from that of endemism, both of birds and their parasites. Endemism of the island's birds is well documented. Langrand (1995) notes that 64.7% of birds occurring on Madagascar or its neighboring islands are endemic resident species (52.2% endemic to Madagascar and 12.5% endemic to the region). This frequency is considerably elevated in comparison to the rest of the world, and is still higher when only forest-dwelling species are considered (**see p. xx [Wilmé and Goodman]**). The mobility of birds in general, particularly their migratory movements, increases the possibility of birds coming into contact with new parasites. However, few Malagasy species migrate between landmasses. Only four species that nest in Madagascar migrate to Africa. One species in Africa and a small number of palearctic birds (most of the Charadriiformes and two hawks) that nest in Africa migrate to Madagascar. This combination of strong endemism amongst the Malagasy avifauna and only moderate migratory movements serves to isolate the island's bird community. Thus, one might expect a large number of species of bird parasite that are restricted to Madagascar and its neighboring islands. This is the hypothesis that we address in this chapter.

We present here a bibliographical review of studies of Malagasy bird endoparasites. These are parasites of blood, tissue, and the intestinal system (protozoa and helminthes). Most of the surveys reviewed here concern wild birds. Endoparasites of poultry are not covered in detail because of the paucity of studies concerning these cosmopolitan parasites in Madagascar. Brygoo (1975) and Putnam (1997) published bibliographic lists related to Malagasy parasites and birds, respectively. Bacteria and viral infections are not considered here, nor are endoparasites and ectoparasites, which are covered elsewhere in this volume (**see p. xx [OConnor]**).

PROTOZOA

The protozoa are a subkingdom containing seven phyla (Levine et al 1980). Two of these phyla (Apicomplexa and Sarcodina) contain parasitic protozoa frequently observed in the blood of birds (Reid 1991).

Many catalogues of blood parasites of birds have been produced from different countries or regions. A review by Bennett et al (1992) of the literature on blood parasites of

sub-Saharan birds belonging to 826 species shows that the most commonly occurring taxa were members of the genus *Haemoproteus* (19.1 % of birds). Twenty-five species of *Leucocytozoon* were recorded in 8.3 % of the birds and represented the second most frequently encountered group of haematozoa. Species of *Plasmodium*, *Trypanosoma*, and filarioids (as microfilariae) occurred in 3.5%, 2.5%, and 2.8%, respectively, of the birds sampled. Species of *Aegyptianella*, *Atoxoplasma*, *Babesia*, and *Hepatozoon* were infrequently seen. Another study concerning east African birds showed the same genera of blood parasites: *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon*, and *Trypanosoma* (Peirce 1976).

There are a few reports of blood parasites from birds on Madagascar. The first study sampled 64 wild-caught birds (Bennett & Blancou 1974) among which 22% with haematozoa. Fourteen birds of eight species harbored *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, *Trypanosoma*, and *Lankesterella*, always at weak densities and usually at less than 1 parasite per 10,000 erythrocytes. A small sample of 10 birds from the Parc National d'Andringitra has also been published (Greiner et al 1996). The following blood parasites were found in six individuals: *Haemoproteus*, *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and microfilariae nematodes, which will be described below (cf. Helminthes). The five species of birds were *Otus rutilus*, *Philepitta castanea*, *Terpsiphone mutata*, *Vanga curvirostris*, and *Foudia omissa*, with some individuals harboring two different parasite species.

Some studies have been conducted on islands around Madagascar. On the Mascarene Islands the following avian hematozoa were found: *Leucocytozoon* and *Plasmodium*. The combined incidences of hematozoa were 40% on Mauritius (n=281), 54% on La Réunion (n=67), and 29% on Rodrigues (n=59; Peirce et al 1977; Peirce 1979). Microfilariae were absent. Twenty-two percent of the land birds sampled on Aldabra were infected with *Haemoproteus* and/or *Plasmodium*, and with microfilariae (Lowery 1971).

Phylum Apicomplexa

Avian malaria is found in every continent and probably every country of the world, which can easily be explained by the vast migratory flights of birds (see chap. 17, Garnham 1966). About 65 species of *Plasmodium* from over 1000 different bird species have been described, but some 35 or less are considered to be valid (Springer 1991). Their distribution among taxa is not uniform: there is a greater concentration in the passerines, a lower incidence in galliforms, and a complete absence in parakeets. Transmission is by Culicinae mosquitoes. The species determination of *Plasmodium* is always problematic. As an example, the morphological characteristics of *P. rouxi* are: constant presence of two unequal grains of pigment in very young stages of the parasite, its rectangular form and small size, the production of four merozoites in the mature schizont and the elongate shape of the gametocytes which do not exceed 10 µm in length and do not curve round the nucleus of the erythrocyte. If more merozoites are present, the organism is not *P. rouxi*. However, if the number is limited to four, it could be *P. vaughani* (see chap. 22, Garnham 1966). In that context it is not surprising only one species of bird *Plasmodium* had been recorded so far from Madagascar: *Plasmodium rouxi* occurs in *Margaroperdix madagascarensis* and an unidentified *Plasmodium* has been found in the blood of *Saxicola torquata* (Bennett & Blancou 1974).

Leucocytozoon affect blood and tissue cells of internal organs. Approximately 67 valid species have been described around the world. With the exception of a species observed in the teiid lizard in Brazil, all species of *Leucocytozoon* are found in birds. The life cycle includes reproduction by sporogony in insect, schizogony in tissue cells, and gametogony in erythrocytes or leukocytes of birds. Transmission is by simuliid flies and culicoid midges

(Springer 1991; Hsu et al 1973). On Madagascar, species of *Leucocytozoon* were the commonest parasites found: *L. toddi* in *Buteo brachypterus*, *L. ardea* in *Egretta dimorpha*, *L. centropi* in *Centropus toulou*, and *L. fringillinarum* in *Foudia madagascariensis* (Bennett & Blancou 1974). *L. marchouxi*, *L. fringillinarum* and *L. zosteropis* have been found in many species from Mascarene islands (Pierce et al 1977; Pierce 1979).

Haemoproteus infections are characterized by schizogony in visceral endothelial cells, gametocyte development in circulating erythrocytes, and presence of pigment in infected erythrocytes. Transmission is by various biting dipterans of the families Hippoboscidae and Ceratopogonidae. Of the 133 named species of *Haemoproteus*, 114 occur in birds, 16 in reptiles, and 3 in amphibians. Fourteen orders and 47 families of birds are parasitized, mostly in wild waterfowl, raptors, and passerines (Levine & Campbell 1971; Springer 1991). Co-infections of *Haemoproteus* and *Leucocytozoon* are rare, which suggests that the ecology or ethology of the vectors must be different for these genera, even in those cases in which the vectors belong to the same genus (Hsu et al 1973). On Madagascar, Bennett & Blancou (1974) did not find evidence of haemoproteid infection in birds and they considered this point as an unexplained anomaly. In other reports, Haemoproteidae were noted as "quite common" in Malagasy birds (Brygoo 1963), in blood of Malagasy *Otus rutilus* (Greiner et al 1996), and are considered the dominant avian haematozoan in mainland Africa (Bennett et al 1992).

The genus *Hepatozoon* is an intraerythrocytic apicomplexan parasite that has been described from all groups of vertebrates. *Hepatozoon* species of birds are relatively few in numbers and appear to be uncommon parasites of this group of vertebrates (Smith 1996). This genus has not been reported in Malagasy birds.

Toxoplasmosis is a parasitic disorder of mammals, birds, and reptiles affecting primarily the central nervous system but sometimes also the reproductive system, skeletal muscles, and visceral organs. The majority of infections are inapparent or latent (Springer 1991). *Toxoplasma* belongs to the group of coccidia. A strain of *T. gondii* was isolated from a domestic pigeon (*Columba livia*) in Madagascar. The parasite was observed from blood and tissue smears (Sureau & Uilenberg 1963).

Eimeria and *Cryptosporidium*, which are frequently observed in the intestinal tract of poultry, have not been described in wild Malagasy birds. Otherwise, several coccidia infecting domestic birds infect wild species; the exception is coccidiosis in chickens caused by the genus *Eimeria*. In this case, the strict host specificity eliminates wild birds as sources of infection. Other genera of coccidia that are known all over the world include *Sarcocystis*, *Atoxoplasma*, *Isospora*, *Tyzzeria*, and *Wenyonella* (McDougald & Reid 1991).

Piroplasms are principally parasites of vertebrate blood cells that are transmitted by ticks. The genus *Aegyptianella* is an intraerythrocytic parasite in birds. It is found in poultry (chickens, ducks, geese, turkeys, etc.), but not reported in Madagascar (Grassé 1953).

Phylum Sarcomastigophora

Trypanosoma avium has been found in both *Falco newtoni* and *Acridotheres tristis* (the latter being an introduced species to Madagascar); this is not surprising given that this trypanosome can be found in most species of birds (Grassé 1953). It can be noted that this *Trypanosoma* plus four other species of *Trypanosoma* were reported in sub-Saharan birds (Bennett et al 1994). Except for *Trypanosoma*, no other protozoa belonging to the phylum of Sarcomastigophora have been reported in Madagascar.

HELMINTHS

Cestodes

Birds become infected with Cestodes by eating an intermediate host, and the larval stage of the tapeworm then has access to the intestine. The larval tapeworm is known as a cysticercoid. The intermediate host may be an insect, snail, leech, earthworm, or slug, depending upon the species of tapeworm (Reid & McDougald 1997).

In the family of Davaineidae, *Ophryocotyle bucki*, a Malagasy endemic tapeworm, has been described from *Lophotibis cristata* (Joyeux & Baer 1939). Deblock et al (1962a) named a new species, *O. gretillati*, from a captive penguin *Aptenodytes patagonica*, brought to Madagascar from the Kerguelen Islands. The authors proposed two hypotheses: first, this tapeworm was a new species different from *O. bucki* and imported to Madagascar with its host; second, this species was a synonym of *O. bucki* with morphological differences that could be explained by an adaptation of the parasite to an unusual host. The genera *Raillietina* and *Davainea* are also parasites of birds guts (Raynaud, undated).

In the family of Dilepididae, Poisson (1934) described *Amoebotaenia sphenoides* from a chicken obtained on Madagascar. A new species *Diagonaliporus portei* was reported in *Gallinago macrodactyla*, a Malagasy endemic (Deblock et al 1962b).

Hymenolepis recurvirostrae (Hymenolepidae) was also found in *Gallinago macrodactyla* (Joyeux & Baer 1939). *Diphyllbothrium erinacei europaei* var. *mansoni* (Diphyllbothriidae) has been described from *Acridotheres tristis* (Joyeux et al 1950). Rosé & Broussard (1962) reported *Paronia calcarutenina* (Anoplocephalidae) from *Hypsipetes madagascariensis*. *Cotugnia daynesi*, a new species of tapeworm has been described from material obtained from chickens (Quentin 1963).

Trematodes

The life cycle of all trematodes that parasitize birds requires a mollusk as an intermediate host; some species also use a second intermediate host. Flukes are less host-specific than tapeworms so wild birds can often introduce them in areas where domestic poultry are reared (Reid & McDougald 1997).

Sixteen species of trematodes belonging to six families (Eucotylidae, Dicrocoelidae, Clinostomatidae, Stomylotrematidae, Echinostomatidae, and Strigeidae) have been described from Madagascar (Richard 1962, 1963, 1964a, 1964b; Richard & Brygoo 1978). Another report (Chabaud & Brygoo 1964) added interesting conclusions concerning the endemism of these parasites. The author concluded that trematodes of birds were rare in Madagascar: 16 described species represented almost all the trematodes collected from more than 300 individual birds. This figure is low when compared with the number of species of nematodes and cestodes obtained from the autopsy of the same birds, and compared to the richness in trematodes from other regions. The most widely represented families were the Strigeidae and Echinostomatidae, which are widespread around the world. Moreover, the level of endemism of trematodes on Madagascar was considered low -- no new genus was described and only six new species of trematodes out of 16 were reported. Notably, among the six new species, three were observed in endemic birds: *Zonorchis dollfusi* in *Coracina cinerea*, *Echinostoma caproni* in *Falco newtoni*, and *Patagifer brygooi* in *Lophotibis cristata* (Richard 1964a).

A member of the family of Paramphistomatidae (*Zygocotyle lunata*) was reported in a native wild duck (Richard & Daynès 1966). This parasite could occur in birds and mammals that possibly introduced it in Madagascar.

Nematodes

Nematodes constitute the most important group of helminthes parasites. In both number of species and amount of damage done, they far exceed the trematodes and cestodes (Ruff 1997). Both direct and indirect life cycles are found in this large group of parasites. Unlike trematodes, many new species from Madagascar have been described in this group. Most of these are found in endemic birds (Richard 1964a).

Several species of filaria (adult form) were named from endemic birds (Chabaud et al 1959, 1964). Three families were reported: Diplotriaenidae, Filariidae, and Onchocercidae. According to these authors, the geographical isolation of the island seems to have been sufficient enough for new species of filaria to have evolved, but their morphological differentiation is not particularly pronounced as compared with certain nematodes of Malagasy amphibians or mammals (Chabaud et al 1959). The level of endemism of filaria of Malagasy birds was considered low in general (Chabaud & Brygoo 1964). Microfilaria are the microscopic larvae of adult filarial nematodes occurring in blood. Brygoo & Quesnel (1954) have also described microfilaria in three *Corvus albus* killed near Antananarivo; they failed to obtain the corresponding adult filaria.

Concerning the superfamily of Spiruroidea, eight new species (*Cyrnea insularis*, *C. caproni*, *Viguiera viduae*, *V. dorsti*, *Geopetitia madagascariensis*, *Spiralatus baeri*, *Torquatella balanocephala*, and *Synhimantus dolichocolpus*) were described in endemic birds from Nosy Be (Chabaud 1960; Chabaud et al 1963). Three species of Acuariidae were found in the gizzard of the Palearctic migrant *Numenius phaeopus*, a bird taken on the Isle Europa, near Madagascar (Petter 1966). A new nematode of the family Heteroxynematidae (*Syphaciella madagascariensis*) was also found in the endemic Malagasy *Pterocles personatus* (Hugot 1989).

Vassiliades (1970) described 5 new species of nematodes and published a list of 65 nematodes species, which have been found parasitizing 60 Malagasy bird species. He observed that numerous nematode families usually paraziting birds in other parts of the world seem to be lacking in Madagascar (i.e. Trichuridae (genus *Capillaria*), Trichostrongylidae (genus *Ornithostrongylus*), Anisakidae, Ascaridiidae, Heterakidae, Subuluridae, Tetrameridae and Physalopteridae), whereas the two superfamilies Spiruroidea and Filarioidea are widely distributed in the island. Most of the 26 endemic nematodes can be considered as regularly vicarious forms to species already known in other part of the world. A higher level of speciation is found in two species only: *Spiralatus baeri* and *Heimnema heimi*, which belong to evolutive stems that have been unable to parazite birds out of Madagascar. Concluding on the Malagasy nematodes, this author noted that the morphological divergences had been weak, compared to those observed in some nematodes paraziting Malagasy reptiles and mammals.

Acanthocephala

This is a small group of endoparasites with invertebrate intermediate hosts. Golvan (1957) described *Gordiorhynchus madagascariensis*, a new species of acanthocephala, from the raptor *Polyboroides madagascariensis* (= *P. radiatus*). The same author (1956) identified another species *Pseudoporrorchis centropi*. *Empodius segmentatus* was also noticed in the gut of *Numida*, a genus that maybe introduced to Madagascar (Raynaud, undated).

Conclusion

As far as we know, this review is the first to treat endoparasites of Malagasy birds. Increasing knowledge of endogenous parasites of birds exceeds pure encyclopedic interest. It gives us tools and data to predict possible horizontal transfers that could lead to emerging diseases in birds. For example, the extinction of indigenous birds in the Hawaiian islands has been linked with the introduction of a new avian malaria parasite (Atkinson et al 1995). In addition, *Plasmodium falciparum*, the only species that kills humans, is closely related to avian malaria parasites (Rich et al 1998). This increasing knowledge is also of special interest for veterinarian services in charge of preventing and treating domestic poultry.

Research on this subject provides an interface between biodiversity and species interactions. Studies on biodiversity often equate the number of species and their interrelationships with the idea that the greater number of forms is a marker of the good health of an ecosystem or complexity. Parasitism also participates to this biodiversity and, when non-virulent, is thought to be an expression of a long-term stability of the ecosystem.

It can be underlined that all species identified in Madagascar and cited in this review have been described only on the basis of their morphological or microscopical aspects. Molecular studies are needed to more completely understand the patterns of specification amongst bird endoparasites, especially for the phylum Protozoa.

In the introduction we raised the question of parasitism in Malagasy birds, focusing on two important aspects -- strong levels of local endemism and little interchange with continental faunas through migration. We have shown that endoparasites present across the globe are found in Malagasy wild birds; however, marked differences have been found between class and subclass representation. Given that extensive research has not been conducted on Malagasy birds, it seems premature to interpret patterns of species richness or presence or absence of some parasite families. With these caveats in mind, it is interesting to note that some nematode families seem to have experienced speciation in Madagascar, but this does not seem to be the case for trematodes. Concerning the protozoa, data are insufficient to draw any firm conclusions.

Emerging diseases are indeed of particular concern in the context of a developing country whose economic priorities could lead to changing environmental conditions (deforestation, development of intensive breeding of poultry, etc.) that increase the probability of emergence of new pathogens.

Atkinson, C.T., Woods, K.L., Dusek, R.J., Sileo, L.S., and Iko, W.M. 1995. Wildlife disease and conservation in Hawaii: pathogenicity of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected iiwi (*Vestiaria coccinea*). *Parasitology* 111, Supplement S59-S69.

Bennett, G.F., and Blancou, J. 1974. A note of the blood parasites of some birds from the Republic of Madagascar. *Journal of Wildlife Disease* 10: 239-240.

Bennett, G.F., Earlé, R.A., Du Toit, H., and Huchzermeyer, F.W. 1992. A host-parasite catalogue of the haematozoa of the sub-Saharan birds. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 59: 1-73.

Bennett, G.F., Earlé, R.A., and Squires-Parsons, D. 1994. Trypanosomes of some sub-Saharan birds. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 61: 263-71.

Brygoo, E.R. 1963. Contribution à la connaissance de la parasitologie des caméléons malgaches. Thèse de Sciences naturelles de l'Université de Paris, Série A, N° 4107, N° d'ordre 4958.

Brygoo, E.R. 1975. Bibliographie de la zoologie parasitaire des vertébrés de Madagascar. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar* 44: 245-286.

Brygoo, E.R., and Quesnel, J.J. 1954. Microfilaire sanguinicole chez *Corvus albus*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 47: 833-835.

Chabaud, A.G. 1960. Quatre spiruridés parasites d'oiseaux malgaches. *Mémoires de l'Institut scientifique de Madagascar* 14: 105-124.

Chabaud, A.G., Anderson, R.C., and Brygoo, E.R. 1959. Sept filaires d'oiseaux malgaches. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 34: 88-109.

Chabaud, A.G., and Brygoo, E.R. 1964. L'endémisme chez les helminthes de Madagascar. *Comptes Rendus de la Société Biogéographique* 356: 3-13.

Chabaud, A.G., Brygoo, E.R., and Durette, M.C. 1963. Spiruridés, parasites d'oiseaux malgaches (deuxième note). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 38: 93-108.

Chabaud, A.G., Brygoo, E.R., and Richard, J. 1964. Filaires d'oiseaux malgaches. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 39: 69-94.

Deblock, S., Capron, A., and Broussart, J. 1962a. *Ophryocotyle gretillati* n. sp. parasite d'*Aptenodytes patagonica* (oiseau sphéniciforme). *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar* 31: 56 -61.

Deblock, S., Capron, A., and Broussart, J. 1962b. *Diagonaliporus portei* n.sp. parasite de *Capella macrodactyla* (oiseau Charadriiformes). *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar* 31: 62-67.

Garnham, P.C.C. 1966. *Malaria parasites and other Haemosporidia*, p.1114. Oxford: Blackwell scientific Publications.

Golvan, Y.J. 1956. Acanthocéphales d'oiseaux. Quatrième note. Considérations sur le genre *Pseudoporrorchis* Ch. Joyeux et J.G. Baer 1935 (Polymorphidae-Porrorchinae) et redescription de *Pseudoporrorchis centropi* (A. Porta 1910). *Bulletin de la Société Zoologique de France* 81: 62-71.

Golvan, Y.J. 1957. Acanthocéphales d'oiseaux. Septième note. *Gordiorhynchus madagascariensis* n. sp. parasite d'un rapace *Polyboroides madagascariensis*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 32: 200-207.

Grassé, P.P. 1953. *Traité de zoologie. Anatomie, systématique, zoologie*. Protozoaires: Rhizopodes, Actinopodes, Sporozoaires, cnidosporidies. Tome 1, fascicule 1 et 2. Paris: Masson et Cie.

- Greiner, E.C., Putnam, M.S., and Goodman, S.M. 1996. Blood parasites from birds in the Réserve Naturelle Intégrale d'Andringitra, Madagascar. In A floral and faunal inventory of the eastern slopes of the Réserve Naturelle Intégrale d'Andringitra, Madagascar: with reference to elevational variation, ed. S.M. Goodman. *Fieldiana: Zoology*, new series, 85: 142-143.
- Hsu, C.K., Campbell, G.R., and Levine, N.D. 1973. A checklist of the species of the genus *Leucocytozoon* (Apicomplexa, Plasmodiidae). *Journal of Protozoology* 20: 195-203.
- Hugot, J.P. 1989. Etude morphologique de *Syphaciella madagascariensis* Vassiliades (Nematoda, Heteroxyneematidae), parasite de *Pterocles personatus* (Aves, Pteroclididae). *Systematic Parasitology* 14: 43-52.
- Joyeux, C., and Baer, J.G. 1939. Sur quelques cestodes de Madagascar. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 32: 39-43.
- Joyeux, C., Baer, J.G., and Gaud, I. 1950. Recherches sur des Cestodes d'Indochine et sur quelques *Diphyllbothrium* (Bothriocéphales). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 43: 482-489.
- Langrand, O. 1995. *Guide des oiseaux de Madagascar*. Lausanne: Delachaux et Niestlé.
- Levine, N.D., and Campbell G.R. 1971. A check list of the species of the genus *Haemoproteus* (Apicomplexa, Plasmodiidae). *Journal of Protozoology* 18: 475-484.
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., and Wallace, F.G. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *Journal of Protozoology* 27: 37-58.
- Lowery, R.S. 1971. Blood parasites of vertebrates on Aldabra. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B* 260: 577-580.
- McDougald, L.R., and Reid, W.M. 1991. Coccidiosis In *Diseases of poultry*. Ninth edition, ed. B.W. Calnek, pp.780-797. London: Wolf Publishing Ltd.
- Peirce, M.A. 1976. Haematozoa of east African birds: I. Blood parasites of birds from Marsabit, Nakuru, Ngulia and east Rudolph in Kenya. *Journal of Wildlife Disease* 12: 148-153.
- Peirce, M.A. 1979. Some additional observations of haematozoa of birds in the Mascarene Islands. *Bulletin of the British Ornithologists' Club* 99: 68-71.
- Peirce, M.A., Cheke, A.S., and Cheke, R.A. 1977. A survey of blood parasites of birds in the Mascarene Islands, Indian Ocean, (with descriptions of two new species and taxonomic discussion by MA Peirce). *Ibis* 119: 451-461.
- Petter, A.J. 1966. Trois espèces d'Acuariidae parasites du gésier de *Numenius phaeopus* à l'île d'Europa. *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle* 38: 940-948.

- Poisson, H. 1934. L'*Amoebotaenia sphenoides* Raillet d'un poulet. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 27: 961.
- Putnam, M.S. 1997. Une bibliographie ornithologique de Madagascar. *Recherches pour le Développement*, Série Sciences Biologiques 11: 2-64.
- Quentin, J.C. 1963. Description de *Cotugnia daynesi* n. sp. cestode parasite de la poule domestique à Madagascar. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 56: 243-251.
- Raynaud, J.P. undated. Systématique simplifiée des helminthes de Madagascar. In Parasitologie des animaux domestiques à Madagascar. Fascicule 1; pp.7-16. Antananarivo: Laboratoire central de l'élevage.
- Reid, M.W. 1991. Protozoa, Introduction. In *Diseases of Poultry*. Ninth edition, ed. B.W. Calnek, p. 779. London: Wolf Publishing Ltd.
- Reid, M.W., and McDougald, L.R. 1997. Cestodes and trematodes. In *Diseases of poultry*, tenth edition, ed. B.W. Calnek, pp. 850-864. London: Wolfe Publishing Ltd.
- Rich, S.M., Licht, M.C., Hudson, R.R., and Ayala, F.J. 1998. Malaria's Eve: evidence of a recent population bottleneck throughout the world populations of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 4425-4430.
- Richard, J. 1962. Trématodes d'oiseaux de Madagascar. Note I. *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle* 34: 172-183.
- Richard, J. 1963. Trématodes d'oiseaux de Madagascar. Note II. Espèces du genre *Stomylotrema* Looss 1900 (Fam. *Stomylotrematridae* Travassos 1922, Poche 1926). *Annales de Parasitologie* 38: 63-75.
- Richard, J. 1964a. Trématodes d'oiseaux de Madagascar. Note III. Espèces de la famille *Echinostomatidae* Poche 1926. *Annales de Parasitologie* 39: 607-620.
- Richard, J. 1964b. Trématodes d'oiseaux de Madagascar. Note IV. Strygéides et Cyathocotylides. *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle* 36: 506-522.
- Richard, J., and Brygoo, E.R. 1978. Cycle évolutif du Trématode *Echinostoma caproni* Richard, 1964 (*Echinostomatoidea*). *Annales de Parasitologie* 53: 265-275.
- Richard, J., and Daynès, P. 1966. *Zygocotyle lunata* (Diesing, 1836) (Trematoda) chez un canard sauvage à Madagascar. *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle* 6: 949-952.
- Rosé, F., and Broussard, J. 1962. *Paronia calcarutenina* Burt 1939, parasite d'*Ixocincla madagascariensis* (oiseau passériforme) - Redescription. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar* 31: 21-28.
- Ruff, M.D. 1997. Nematodes and Acanthocephalans. In *Diseases of poultry*, tenth edition, ed. B.W. Calnek, pp. 731-762. London: Wolf Publishing Ltd.

Smith, T.G. 1996. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *Journal of Parasitology* 82: 565-585.

Springer, W.T. 1991. Other blood and tissue Protozoa. In *Diseases of poultry*, ninth edition, ed. B.W. Calnek, pp. 814-826. London: Wolf Publishing Ltd.

Sureau, P., and Uilenberg, G. 1963. Isolement à partir d'un pigeon domestique (*Columba livia*) d'une seconde souche de *Toxoplasma gondii* à Madagascar. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar* 32: 47-54.

Vassiliades, G. 1970. Nematodes parasites d'oiseaux malgaches. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 45: 47-88.



Accès au campement. Près du village Andranomay.

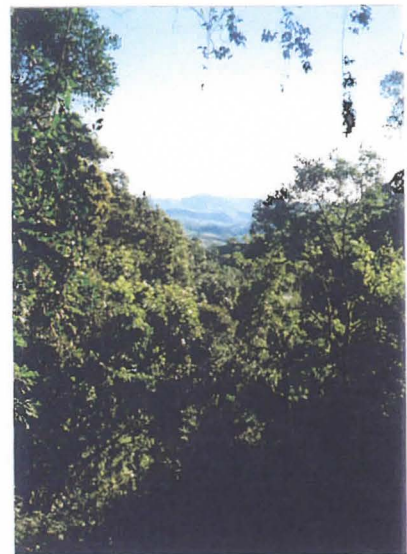


Campement. Forêt d'Ambohimanga

ANNEXE 2. SITE DE CAPTURE des OISEAUX



Monticola sharpei. Mâle adulte



Forêt humide d'Ambohimanga
1300 m d'altitude

ANNEXE 3. COMPTE RENDU DE MISSION 29/05-05/06/01

Liste des Oiseaux capturés et Résultats microscopiques

N°	Nom	Sexe	Age	Décès	Prélèvements				Résultats lecture microscopique						Date Extraction
					Frottis	Sang	Organes	Observations	Plasmodium	Malaria parasites Haemoproteus	Leucocy.	Trypano	Microf.	Observations	
Date de capture : 30/05/01															
1	Nesillas typica	?	J		oui	oui	NF	NF	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NF	
2	Phyllastrephus zosterops	F	J		oui	oui	NF	NF	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NF	
3	Phyllastrephus zosterops	F	A		oui	oui	NF	NF	Neg.	Neg.	Neg.	Pos	Neg.	NF	
4	Monticola sharpei	F	A	DCD	oui	oui	oui	Org: C, R+ F, Ce	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NF	
5	Phyllastrephus zosterops	F	A		oui	oui	NF	NF	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NF	
6	Phyllastrephus zosterops	F	A		oui	oui	NF	NF	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NF	14/06/2001
7	Phyllastrephus zosterops	F	SubA		oui	oui	NF	NF	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NF	14/06/2001
8	Ploceus nelicourvi	M	A		oui	oui	NF	NF	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NF	
9	Phyllastrephus zosterops	?	?		oui	oui	NF	NF	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NF	
10	Phyllastrephus zosterops	?	?		oui	oui	NF	NF	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NF	
11	Calicalicus madagascariensis	F	J		oui	oui	NF	NF	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NF	
12	Newtonia brunneicauda	F		DCD	oui	oui	oui	Prvt intra card. Post-mortem Org: C+ F+ Ce, R+Ce	Pos	Pos	Neg.	Neg.	Neg.	2 Hae. Forme jeune sans pigment	14/06/2001
13	Philepitta castanea	M	SubA		oui	oui	NF	NF	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NF	
14	Foudia omissa	F	A		oui	NF	NF	Lame uniquement	Neg.	Neg.	Pos	Neg.	Neg.	1 leuco.	NF
Date de capture 31/05/01															
15	Oxylabes madagascariensis	?	?		oui	oui	NF	NF	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	PN ?	
16	Oxylabes madagascariensis	?	?		oui	oui	NF	NF	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NF	
17	Philepitta castanea	F	?		oui	oui	NF	NF	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos	Microf courtes	
18	Newtonia amphichroa	M	A	DCD	oui	NF	oui	lame uniquement (griffe) Org: F+ Ce , C	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Lame de mauv. qualite	
19	Newtonia amphichroa	F	A		oui	NF	NF	lame uniquement (griffe)	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Lame de mauv qualite	
20	Philepitta castanea	F	A		oui	oui	NF	NF	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	PNE ?	
21	Philepitta castanea	F	A		oui	oui	NF	NF	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NF	
22	Ploceus nelicourvi	M	A	DCD	oui	oui	oui	Org: F , C + R , F	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Lame de mauv qualite (trop sg)	
23	Phyllastrephus cinereiceps	?	?		oui	oui	NF	NF	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NF	
24	Phyllastrephus zosterops	F	A	DCD	oui	oui	oui	Org: F+ Ce , C+ R	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	PNE ?	
25	Phyllastrephus zosterops	M	A		oui	oui	NF	NF	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NF	
26	Phyllastrephus zosterops	M	A	DCD	oui	oui	oui	Org: F+ Ce , C+ R	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	PNE ?	
27	Neodrepanis coruscans	M	A		oui	NF	NF	Lame uniquement (griffe)	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NF	
28	Newtonia amphichroa	M	?	DCD	oui	NF	oui	Lame uniquement (griffe) Org: F+ Ce , C+ R	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NF	
29	Foudia omissa	F	?		oui	oui	NF	NF	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NF	
30	Monticola sharpei	M	?		oui	NF	NF	Lame uniquement (Psg jug hemat)	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NF	
31	Atelornis crossleyi	F	A	DCD (s)	oui	oui (2 tubes)	oui App.	Org: F+ Ce , C , R Rate hémorragique	Pos	Pos	Neg.	Neg.	Pos. C+ Ce	7 Hae. ou Plasm? Pas de microf dans sg périph.	14/06/2001

N°	Nom	Sexe	Age	Décès	Prélèvements				Résultats Frottis					Date Extraction	
					Frottis	Sang	Organes	Observations	Plasmodium	Malaria para Haemoproteus	Leucocy.	Trypano	Microf.	Observations	
Date de capture: 01/06/01															
32	Newtonia brunneicauda	F	A		oui	oui	NF		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
33	Hypsipetes madagascariensis	?	?		oui	oui	NF		Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Microf courtes	
34	Ploceus nelicourvi	F	A		oui	oui	NF		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
35	Ploceus nelicourvi	F	A	DCD	oui	oui	oui	Org: F+ Ce, P	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
36	Phyllastrephus zosterops	F	A	DCD	oui	oui	NF	Pas de prvt org (place contener)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
37	Phyllastrephus cinereiceps	F	A	DCD	oui	NF	NF	Lame uniquement (griffe) Pas de prvt org (place contener)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
38	Phyllastrephus cinereiceps	M	A	DCD	oui	oui	NF	Pas de prvt org (place contener)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
39	Copsychus albospecularis	F	A		oui	oui	NF		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
40	Hypsipetes madagascariensis	?	?	DCD (a)	oui	oui (PM)	oui	Org: F+ Ce , C+R Rate hypertrophie hemorragique	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Microf +++ / Hae +++ leuco ++ formes cyto (Pl. juxtanucleare ?)	14/06/2001
41	Philepitta castanea	M	SubA		oui	NF	NF	Lame uniquement (griffe)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
Date de capture: 02/06/01															
42	Phyllastrephus cinereiceps	M	A		oui	NF	NF	Lame uniquement (Psg jug hemat)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Lame de mauv qualite	
43	Foudia omissa	F	A		oui	oui	NF	NF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
44	Monticola sharpei	M	A		oui	oui	NF	Hématome	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	8 Hae.	
45	Phyllastrephus zosterops	F	A		oui	oui	NF	NF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
46	Phyllastrephus zosterops	M	A		oui	oui	NF	NF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
47	Phyllastrephus zosterops	M	A		oui	oui	NF	NF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
48	Phyllastrephus zosterops	M	A	DCD	oui	oui	NF	Peu de sang Pas de prvt org (place contener)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
49	Phyllastrephus cinereiceps	M	A	DCD	oui	oui	NF	Pas de prvt org (place contener)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
50	Phyllastrephus zosterops	F	SubA	DCD	oui	oui	NF	Pas de prvt org (place contener)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
51	Oxylabes madagascariensis	M	J	DCD	oui	oui	oui	Très peu de sang Org: F + Ce , C + R	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
52	Oxylabes madagascariensis	F	A	DCD	oui	oui	NF	Très peu de sang Pas de prvt org (place contener)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	GR déshydratés	
53	Oxylabes madagascariensis	F	J	DCD	oui	oui	NF	Sang 0,1 ml Pas de prvt org (place contener)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
54	Phyllastrephus zosterops	F	J	DCD	oui	oui	NF	Sang 0,1 ml Pas de prvt org (place contener)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
55	Oxylabes madagascariensis	M	A	DCD	oui	oui	oui	Org: F + Ce + R + C (prvt 8h P M)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
56	Phyllastrephus cinereiceps	?	A	DCD (a)	oui	oui	NF	Prvt sg post mortem	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
57	Phyllastrephus zosterops	F	A	DCD	oui	oui	NF	Sang: 0,05 ml	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Microf courtes	
58	Phyllastrephus madagascariensis	M	A	DCD	oui	oui	NF	Sang 0,05 ml Pas de prvt org (place contener)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
59	Philepitta castanea	M	SubA	DCD	oui	oui	NF	Pas de prvt org (place contener)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	

N°	Nom	Sexe	Age	Décès	Prélèvements				Résultats Frottis					Date Extraction	
					Frottis	Sang	Organes	Observations	Malaria para			Trypano	Microf.	Observations	
									Plasmodium	Haemoproteus	Leucocy.				
Date de capture 03/06/01															
60	Oxylabes madagascariensis	F	A	DCD	oui	oui	NF	Pas de prvt org (place contener)	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Microf courtes	
61	Phyllastrephus zosterops	F	A		oui	oui	NF	Sang: 0,2 ml	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
62	Copsychus albospecularis	F	SubA		oui	oui	NF	Sang: 0,1 ml	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Hae dans GR sans noyaux	
63	Oxylabes madagascariensis	F	A	DCD	oui	oui	NF	Pas de prvt org (place contener)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
64	Calicalicus madagascariensis	F	A		oui	oui	NF	NF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
65	Philepitta castanea	M	A		oui	oui	NF	NF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
66	Phyllastrephus zosterops	?	?		oui	oui	NF	NF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
67	Terpsiphone mutata	F	?		oui	oui	NF	NF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
Date de capture 04/06/01															
68	Philepitta castanea	F	A	DCD	oui	NF	NF	Lame uniquement (griffe)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
69	Nesillas typica	?	?		oui	oui	NF	NF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
70	Philepitta castanea	?	?		oui	oui	NF	Sang: 0,15 ml	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
71	Newtonia brunneicauda	F	A		oui	NF	NF	Lame uniquement (griffe)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
72	Oxylabes madagascariensis	F	SubA		oui	oui	NF	NF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
73	Oxylabes madagascariensis	F	A		oui	oui	NF	NF	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
74	Phyllastrephus cinereiceps	M	A		oui	NF	NF	Lame uniquement (griffe)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
75	Oxylabes madagascariensis	F	A	DCD	oui	NF	NF	Lame uniquement (griffe)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
76	Philepitta castanea	M	SubA		oui	NF	NF	Lame uniquement (griffe)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
77	Phyllastrephus cinereiceps	F	A		oui	NF	NF	Lame uniquement (griffe)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	NF	
	TOTAL								3 ?	5	2	2	6		

Legendes: DCD (a) = oiseau décédé avant prélèvement

DCD (s)= oiseau sacrifié

Org= organes

F= foie, C=cœur, R= rate, Ce= cerveau, P= poumons

PM= prélèvement post-mortem

SubA= Subadulte

J= juvénile

App= Apposition d'organes

PN=polynucléaires

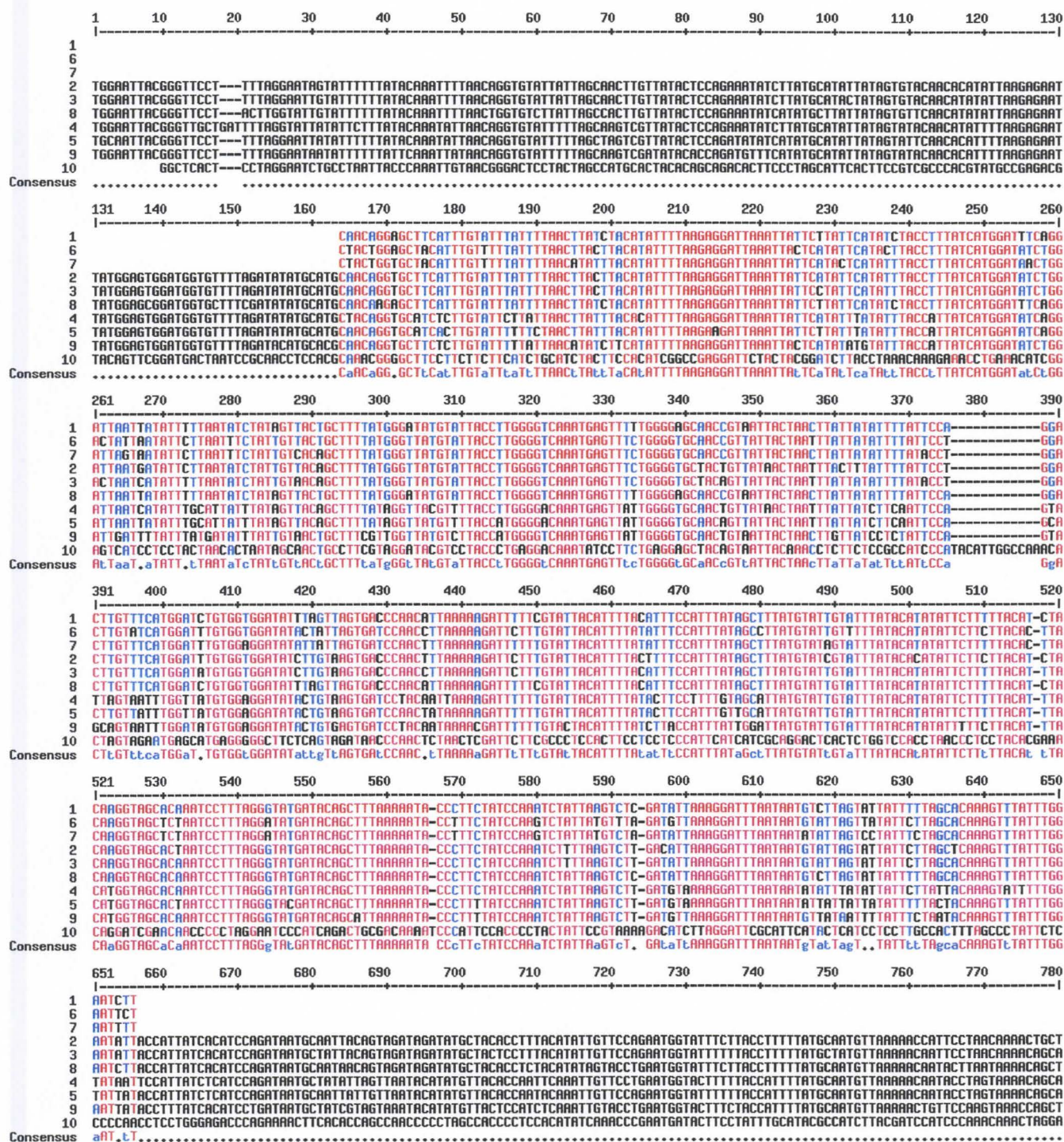
PNE=éosinophiles

ANNEXE 4. ALIGNEMENT de SEQUENCES CYTOCHROME *b*

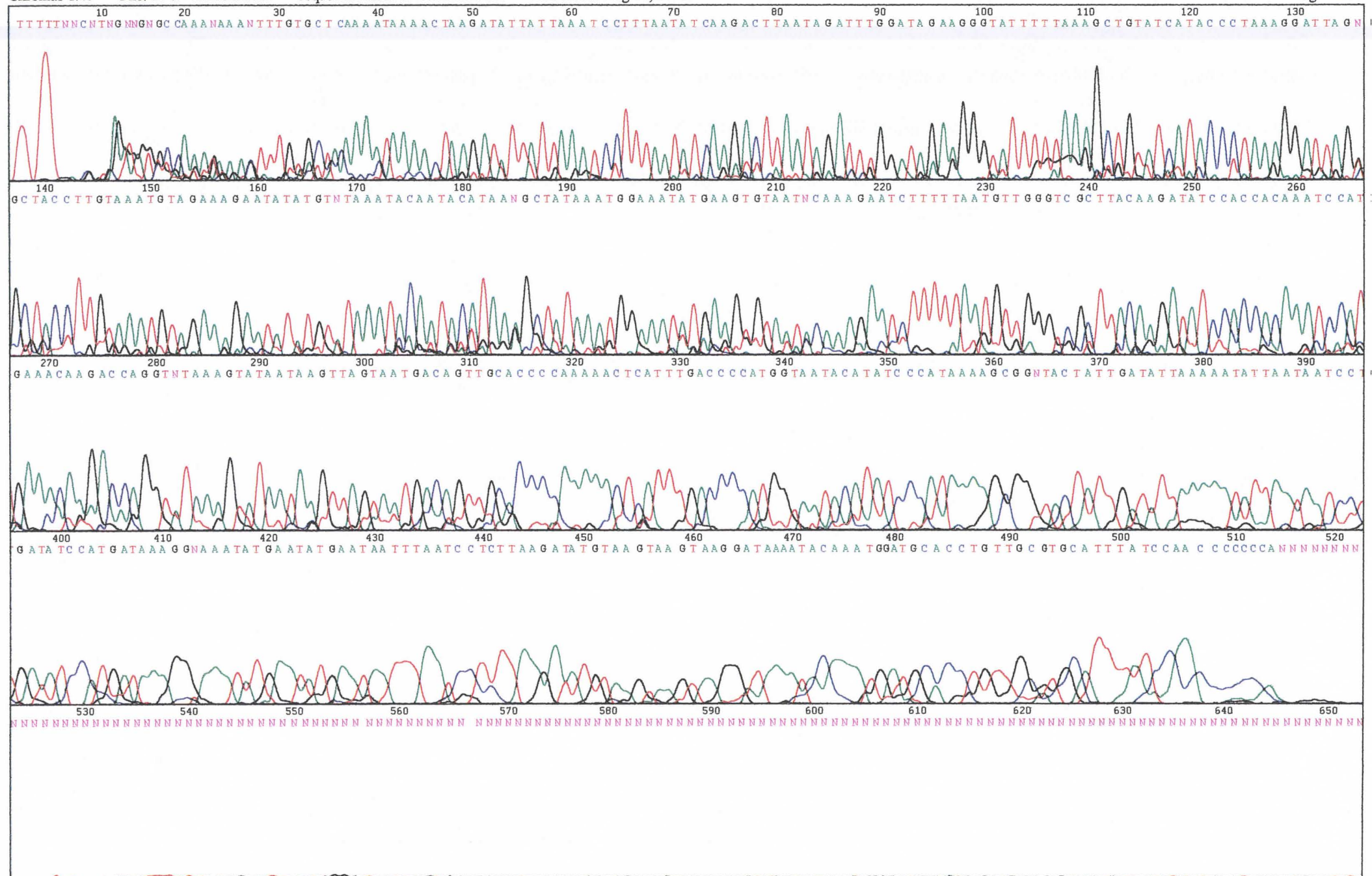
Multalin : <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>

Légendes des séquences :

1. *Plasmodium nucleophilum*
2. *Plasmodium gallinaceum*
3. *Plasmodium elongatum*
4. *Plasmodium vivax*
5. *Plasmodium malariae*
6. *Haemoproteus sylvae*
7. *Haemoproteus majoris*
8. *Haemoproteus columbae*
9. *Plasmodium falciparum*
10. *Acrocephalus schoenobaenus* (oiseau)



ANNEXE 5. ALIGNEMENT et CHROMATOGRAMME de SEQUENCES RECUES



<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>

ois.40
P.nala.
P.falci
P.vivax
consensus,
ois.12
Consensus

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90

TTGGATAAATGCACGCACAGGTCATCCATTGTATTTATCTTACTTACTTACATATCTTAAGAGGATTAAATTTATTCATATTC
GTGGATAAATGCACGCACAGGTCATCCATTGTATTTTTC-TAACTTATTTACATATTTTAAGAGGATTAAATTTATTCATATTC
GGNGGANAANAAGCAGGCACAGGTCATCTCTT-GTATTTTATTAACATATCCTCATATTTTAAGAGGATTAAATTTATTCATATTC
GGGGTGGAAAAGG-ACGCTACAGGGGATCCCT-GNATTCNTAA-TAACNTATNTACACATTTTAAGAGGATTAAATTTATTCATATTC
CAACAGG-GCTTCATTT-GTATTTATTT-TAACTTATTTACATATTTTAAGAGGATTAAATTTATTCATATTC
ATTTANATTAACCTTACTTACATATTTTAAGAGGATTAAATTTATTCATATTC
...gga.aaa.g.acgcaacagg.gc.tc..tt gtatTtt... TAACTTactTACATATTTTAAGAGGATTAAATTTATTCATATTC

91 100 110 120 130 140 150 160 170 180

ATATTTCCTTTATCATGGATATCAGGATTATTAATATTTTAAATCARTAGTANCCGCTTTTATGGGATATGTATTAACATGGGGTCA
ATATTTCCTTTATCATGGATATCAGGATTATTAATATTTTNGCATTATTTATAGTTACAGCTTTTATAGGTTATGTTTACCATGGGGTCA
GTATTTCCTTTATCATGGATATCTGGATTGATTTTATTTATGANNATTTATGTACCGCTTTTATGGTTATGTCTTACCATGGGGTCA
ATATTTCCTTTATCATGGATATCAGGATTATTAATATTTTGAATTTGCAAA-ATTATAG-GCCAGCTTT-ATAGGTTACGTTTATTCCTTGGGGTCA
ATATTTCCTTTATCATGGATATCTGGATTATTAATATTTT--AATATCTATTGTCTACGCTTTTATGGGTTATGTATTAACCTTGGGGTCA
ATATTTCCTTTATCATGGATATCTGGATTATTAATATTTTAAATCTATTAGNACNGCTTTTATGGGTTATGTATTAACCTTGGGGTCA
ATAATTCCTTTATCATGGATATCTGGATTATTAATATTTTAAATCTATTAGNACNGCTTTTATGGGTTATGTATTAACCTTGGGGTCA

ois.40
P.nala.
P.falci
P.vivax
consensus,
ois.12
Consensus

181 190 200 210 220 230 240 250 260 270

AATGAGTTTGGGGTGCACCTGTCATTACTAATCTTATTAATCTTANACCTGGCTTGTTCATGGATTGTGGTGGATATCTGTAG
AATGAGTTTGGGGTGCACCTGTCATTACTAATCTTATTAATCTTCAATCCAGCNCCTTGTATTGGTTATGTGGAGGATATCTGTAG
AATGAGTTTGGGGTGCACCTGTCATTACTAATCTTGTATCTCTATCCAGTANCAATTTGGATTGTGGAGGATATCTGTAG
AATGAGTTTGGGGTGCACCTGTCATTACTAATCTTATTAATCTTCAATCCAGTATTAATTTGGTTATGTGGAGGATATCTGTAG
AATGAGTTTGGGGTGCACCTGTCATTACTAATCTTATTAATCTTCAATCCAGTATTTGTTCATGGATTGTGGTGGATATCTGTAG
AATGAGTTTGGGGTGCACCTGTCATTACTAATCTTATTAATCTTCAATCCAGTATTTGTTCATGGATTGTGGTGGATATCTGTAG
AATGAGTTTGGGGTGCACCTGTCATTACTAATCTTATTAATCTTCAATCCAGTATTTGTTCATGGATTGTGGTGGATATCTGTAG

ois.40
P.nala.
P.falci
P.vivax
consensus,
ois.12
Consensus

271 280 290 300 310 320 330 340 350 360

CGACCCACAA-TTAAAGAGATTTTGNATTACCTTCATTTCCATTTATAGCCTTATGATTGTATTTANACATATATCTTTTAC
TGATCCACTA-TTAAAGAGATTTTGNATTACCTTTATCTCCATTTGTCATTTATGATTTATACATATATCTTTTAC
TGATCCACTA-TTAAAGAGATTTTGNATTACCTTTATCTTACCTTTATGGATTATGATTGTATTTATACANATATTTTCTTAC
TGATCCACTA-TTAAAGAGATTTTGNATTACCTTTATCTTACCTTTGTCATTTATGATTGTATTTATACANATATTTTCTTAC
TGATCCACTA-TTAAAGAGATTTTGNATTACCTTTATCTTACCTTTGTCATTTATGATTGTATTTATACATATATCTTTTAC
TGATCCACTA-TTAAAGAGATTTTGNATTACCTTTATCTTACCTTTGTCATTTATGATTGTATTTATACATATATCTTTTAC
TGATCCACTA-TTAAAGAGATTTTGNATTACCTTTATCTTACCTTTGTCATTTATGATTGTATTTATACATATATCTTTTAC

ois.40
P.nala.
P.falci
P.vivax
consensus,
ois.12
Consensus

361 370 380 390 400 410 420 430 440 450

ATTTACAGGTAGCCTAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTT-AAATATACCTTCTATCCAATCTATTAGCTTTGATATTAAGGA
ATTTACAGGTAGCCTAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTT-AAATATACCTTCTATCCAATCTATTAGCTTTGATATTAAGGA
ATTTACAGGTAGCCTAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTT-AAATATACCTTCTATCCAATCTATTAGCTTTGATATTAAGGA
ATTTACAGGTAGCCTAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTT-AAATATACCTTCTATCCAATCTATTAGCTTTGATATTAAGGA
ATTTACAGGTAGCCTAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTT-AAATATACCTTCTATCCAATCTATTAGCTTTGATATTAAGGA
ATTTACAGGTAGCCTAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTT-AAATATACCTTCTATCCAATCTATTAGCTTTGATATTAAGGA
ATTTACAGGTAGCCTAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTT-AAATATACCTTCTATCCAATCTATTAGCTTTGATATTAAGGA

ois.40
P.nala.
P.falci
P.vivax
consensus,
ois.12
Consensus

451 460 470 480 490 500 5112

TTTAAATATATCTTAGTTTATTTTGGAGC-ACAAATTTNTTTGGCNCNNCNAAGNNAARA
TTTAAATATATCTTAGTTTATTTTGGAGC-ACAAATTTNTTTGGCNCNNCNAAGNNAARA
TTTAAATATATCTTAGTTTATTTTGGAGC-ACAAATTTNTTTGGCNCNNCNAAGNNAARA
TTTAAATATATCTTAGTTTATTTTGGAGC-ACAAATTTNTTTGGCNCNNCNAAGNNAARA
TTTAAATATATCTTAGTTTATTTTGGAGC-ACAAATTTNTTTGGCNCNNCNAAGNNAARA
TTTAAATATATCTTAGTTTATTTTGGAGC-ACAAATTTNTTTGGCNCNNCNAAGNNAARA
TTTAAATATATCTTAGTTTATTTTGGAGC-ACAAATTTNTTTGGCNCNNCNAAGNNAARA

ois.40
P.nala.
P.falci
P.vivax
consensus,
ois.12
Consensus

tttaataat.t.....tt.tattt...a..acaaa.tttatttgg.....