

Summary

Complete development of *Cryptosporidium in vitro* : applications

Protozoan parasites of the genus *Cryptosporidium* cause a short term, flu-like, gastrointestinal illness in immunocompetent persons and a severe, persistent life threatening diarrhea in immunodeficient patients. No effective therapy is available for the treatment of cryptosporidiosis in the immunodeficient host. Complete development (from sporozoite to sporulated oocyst) of *Cryptosporidium* was achieved in cultured human colon cancer cells (CACO2 cells) which *in vitro* acquired the enterocyte's characteristics. The growth of *Cryptosporidium* in CACO2 cells provides a novel means for research in the field of drug screening. Spiramycin seemed to have some effects *in vivo* and at first, the authors tested this drug. Initially, spiramycin's toxicity and its penetration in CACO2 cells were evaluated; then its activity on cultured *Cryptosporidium* was tested. Spiramycin revealed itself to be completely ineffective. The same negative results were observed with eflornithine, mefloquine, pentamidine, mefloxacine, norfloxacine, pefloxacine and imipenem.

ADRESSE

A. Daty : maître de conférences des universités, praticien hospitalier. M. Danis : professeur des universités, praticien hospitalier. M. Gentilini : professeur des universités, chef de service. Département de parasitologie, médecine tropicale et santé publique et INSERM U. 313, hôpital de la Salpêtrière, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France.

TIRÉS A PART

A. Daty.

Développement complet de *Cryptosporidium* en culture cellulaire : applications

Annick Daty, Martin Danis, Marc Gentilini

Les protozoaires du genre *Cryptosporidium* (Phylum Apicomplexa, sous-ordre Eimeriina) sont des coccidies de petite taille (2 à 6 µm), se développant dans les cellules épithéliales de l'intestin de nombreux animaux et de l'homme [1].

Cryptosporidium est décrit pour la première fois en 1907 par Tyzzer dans les cryptes gastriques d'une souris ; ce n'est qu'en 1955 que Slavin lui reconnaît un rôle pathogène chez le dindon [2, 3]. Depuis cette date, la cryptosporidiose est devenue une étiologie importante de gastro-entérite et de diarrhée dans de nombreuses espèces animales, spécialement les veaux, les agneaux, les chèvres et l'homme [4].

De 1976 à 1981, les sept premiers cas humains de cryptosporidiose sont rapportés [5, 6]. Cinq de ces patients sont immunodéprimés et *Cryptosporidium* est considéré comme un protozoaire opportuniste rare chez l'homme. De 1981 à 1982, 47 autres cas sont recensés par le CDC, la plupart survenant chez des patients atteints de SIDA [7, 8]. Dès lors, le nombre de cas de cryptosporidiose humaine ne cesse de croître avec l'ascension du SIDA.

La cryptosporidiose des immunodéprimés, et surtout ceux atteints de SIDA, diarrhée sévère, prolongée, parfois cholériforme, contraste avec la courte gastro-entérite, s'éteignant d'elle-même, du sujet immunocom-

pétent [9, 10]. Les techniques simples mises en œuvre pour la détection des oocystes de *Cryptosporidium* permettent de donner une étiologie aux diarrhées jusqu'alors inexplicables de l'enfant, surtout en zone tropicale, avec une fréquence parfois supérieure à 30 % [11-14].

Des infections respiratoires et biliaires à *Cryptosporidium* montrent que ce protozoaire n'est pas toujours confiné au tractus digestif [15, 16].

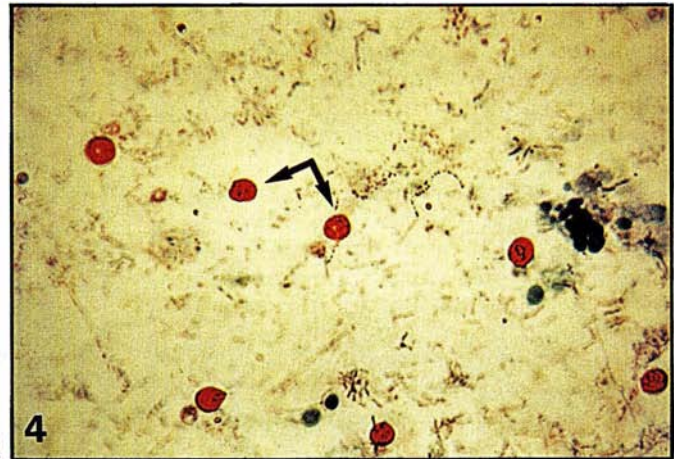
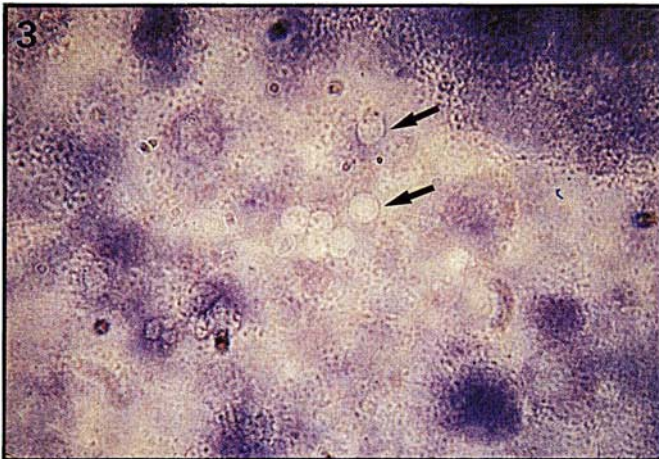
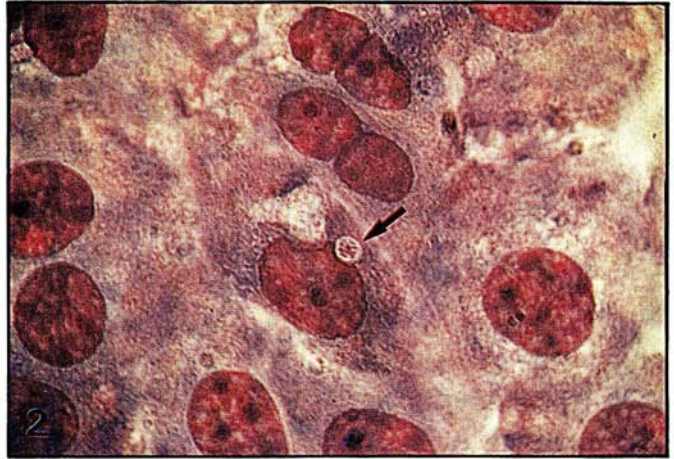
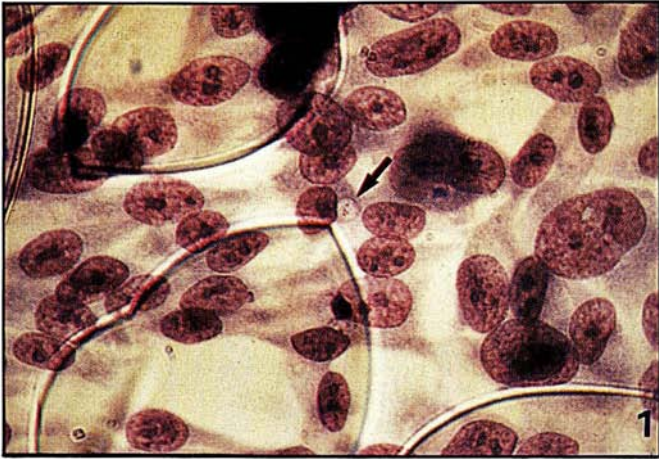
Les infections expérimentales prouvent qu'il n'existe pas de spécificité d'hôte et le mode de contamination s'effectue par ingestion d'oocystes sporulés et infectieux dès leur émission dans les selles [17].

L'homme s'infeste par l'intermédiaire des animaux infectés, des hommes malades ou porteurs sains, ou par des eaux polluées [18-20].

L'absence de molécules actives sur *Cryptosporidium* crée actuellement une difficulté majeure. Les multiples essais thérapeutiques restent vains chez l'homme [21, 22]. Les oocystes de *Cryptosporidium* résistent aux désinfectants usuels, posant le problème de désinfection des endoscopes et des eaux polluées [23].

Le développement complet de *Cryptosporidium* est réalisé dans des embryons de poulet, puis sur cellules fœtales humaines de poumon [24, 25].

A la lumière de ces travaux, nous avons obtenu le cycle complet de *Cryptosporidium* sur hépatocytes et



1. *Schizonte à quatre noyaux de Cryptosporidium, obtenu après infestation de mélanocytes en culture.*
2. *Microgamétocyte de Cryptosporidium obtenu après infestation d'hépatocytes en culture.*
3. *Stades endocellulaires de Cryptosporidium obtenus après infestation des cellules CACO2.*
4. *Oocystes de Cryptosporidium provenant de selles d'un patient atteint de cryptosporidiose, colorés par la coloration de Ziehl-Neelsen.*
5. *Oocystes de Cryptosporidium de culture colorés par la coloration de Ziehl-Neelsen.*

sur une lignée cellulaire issue de cancer colique humain (lignée CACO2 obtenue de J. Fogh, Sloan Kettering Institute for Cancer Research, Rye, NY, États-Unis) [26]. Les cellules CACO2 acquièrent spontanément en culture une différenciation de type entérocytaire. Ce modèle *in vitro* donne une bonne corrélation avec le cycle humain et permet d'apprécier l'activité de molécules potentiellement actives chez l'homme [27, 28]. La culture de *Cryptosporidium* *in vitro* permettrait de déterminer avec précision la biologie du parasite intracellulaire en l'absence d'autres éléments pathogènes.

Développement complet de *Cryptosporidium* *in vitro*

Méthodes d'étude.

(1) Obtention d'ocystes purifiés de *Cryptosporidium*: les ocystes de *Cryptosporidium* proviennent des selles de patients atteints de SIDA et qui présentent une cryptosporidiose chronique. Les selles sont stockées à 4°C dans une solution à 2,5 % de bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) pendant au moins trois mois. Les ocystes sont ensuite purifiés et concentrés par flottation dans une solution sucrée de Sheather et lavés trois fois par centrifugation dans de l'eau distillée stérile. La totalité des levures et bactéries est éliminée par mise en suspension des ocystes dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1,75 % pendant une heure.

(2) Obtention des sporozoïtes. Après plusieurs lavages, les ocystes sont incubés une heure en agitation à 37°C dans de la trypsine EDTA 1 X-taurocholate. Les sporozoïtes libérés sont lavés deux fois dans un tampon phosphate (PBS, pH = 7,2) et resuspendus dans le milieu de culture (MEM Dulbecco ou RPMI).

(3) Infestation des cellules. 150 000 sporozoïtes sont ajoutés sur quatre milieux cellulaires cultivés en monocouche dans des boîtes de Petri Falcon 35 min contenant 1,5 ml de milieu: (a) des cellules de mélanome (ATCC n° CRL 1585) cultivées en milieu RPMI avec 10 % de SVF (sérum de veau foetal); (b) des primocultures d'hépatocytes humains ou de rats maintenus en survie dans

un milieu MEM avec 10 % de SVF; (c) la lignée cellulaire CACO2 qui acquiert *in vitro* les caractéristiques de l'entérocyte et est entretenue dans un milieu MEM Dulbecco avec 20 % de SVF.

• **Résultats et discussion (Tableau I)**
Sur les cellules de mélanome, le cycle complet n'a pu être obtenu. Seuls des trophozoïtes et des schizontes sont observés. Dans les hépatocytes de rat ou humains, des schizontes à huit et à quatre noyaux apparaissent dès les premières 24 heures et les ocystes, dès le 3^e jour avec un pic d'émission aux 5^e et 6^e jours. Sur les cellules de la lignée CACO2, il est difficile d'apprécier les stades endocellulaires; toutefois, le cycle complet de *Cryptosporidium* est

aussi obtenu puisque des ocystes apparaissent dans les milieux de culture le 3^e jour, avec un pic d'émission aux 5^e et 6^e jours, beaucoup plus important que sur les autres supports cellulaires.

Les ocystes de culture obtenus sur les hépatocytes et sur les cellules de la lignée CACO2 sont traités par le mélange trypsine-taurocholate et sont inoculés à des cellules CACO2. L'obtention d'un nouveau cycle prouve la viabilité de ces ocystes de culture.

La spécificité du sporozoïte semble faible, puisque *Cryptosporidium* peut se développer sur des cellules très variées [24-26].

Cependant, le développement intracellulaire du protozoaire présente de grandes variations. La lignée cellulaire CACO2 permet un rendement

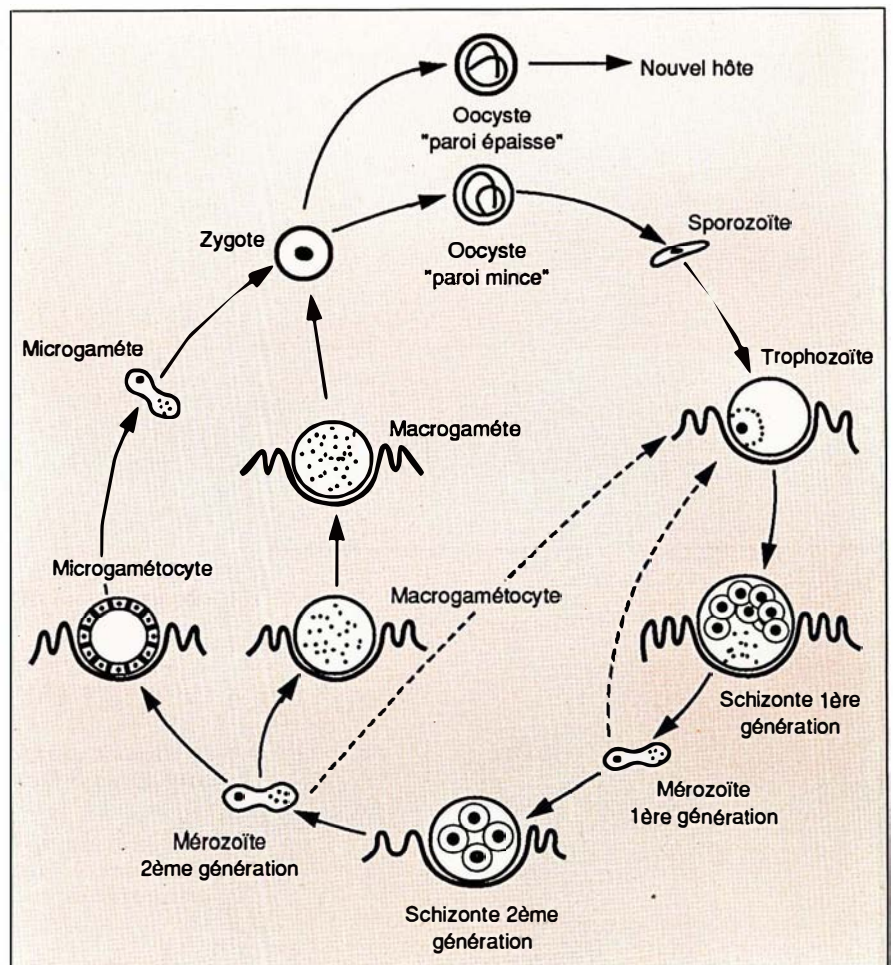


Figure 1. Schéma du cycle parasitaire de *Cryptosporidium*.

Tableau I

APPRECIATION SEMI-QUANTITATIVE DES FORMES PARASITAIRES OBTENUES AVEC LES DIFFERENTS SUPPORTS CELLULAIRES EN FONCTION DU TEMPS

Cellule	Mélanome				Hépatocyte de rat				Hépatocyte humain				Lignée CACO2			
	SI	SII	M.m	OO	SI	SII	M.m	OO	SI	SII	M.m	OO	SI	SII	M.m	OO
J1	0	0	0	0	+/-	+/-	0	0	+/-	+/-	0	0	-	-	-	0
J2	+/-	+/-	0	0	++	++	++	0	+	+	0	0	-	-	-	0
J3	+/-	+/-	0	0	++	++	++	+	+	+	+	+	-	-	-	+
J4	0	+/-	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	-	-	-	++
J5	0	+/-	0	0	+	+	+	++	0	+	+	+	-	-	-	+++
J6	0	0	0	0	0	0	+	++	0	0	0	+	-	-	-	+++
J7	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	-	-	-	++

0 = absent; +/- = rare; + = faible; ++ = nombreux; +++ = très nombreux; SI = schizonte de 1^{re} génération; SII = schizonte de 2^e génération; M.m = macro- et microgamétocytes; OO = oocystes.

RÉFÉRENCES

1. Tzipori S. Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiol Rev* 1983; 47: 84-96.
2. Slavin D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J Comp Pathol Ther* 1955; 70: 592-8.
3. Tyzzer EE. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 1907; 5: 12-3.
4. Schultz MG. Emerging zoonoses. *N Engl J Med* 1983; 308: 1285-6.
5. Meisel JL, Perera DR, Meligro C, Rubin CE. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 1976; 70: 1156-60.
6. Weisburger WR, Hutcheon DF, Yardley JH, Roche JC, Hillis WD, Charache P. Cryptosporidiosis in an immunosuppressed renal transplant recipient with IgA deficiency. *Am J Clin Pathol* 1979; 72: 473-8.
7. Centers for Disease Control. Assessment of chemotherapy of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *MMWR* 1982; 31: 589-92.
8. Navin TR, Juraneck DD. Cryptosporidiosis: clinical epidemiologic and parasitologic review. *Rev Infect Dis* 1984; 6: 313-27.
9. Andreani T, Le Charpentier Y, Brouet JC, et al. Acquired immunodeficiency with intestinal cryptosporidiosis. *Lancet* 1983; i: 1187-91.
10. Babb RR, Differding JT, Trollope ML. *Cryptosporidia enteritis* in a healthy professional athlete. *Am J Gastroenterol* 1982; 77: 833-4.
11. Centers for Disease Control. Cryptosporidiosis among children attending day care centers: Georgie, Pennsylvania, Michigan, California, New Mexico. *MMWR* 1984; 33: 599-601.
12. Cross JH, Alcantara A, Alquiza L, Zaraspe G, Ranoa C. Cryptosporidiosis in Phillipine children. *South Asian J Trop Med Pub Health* 1985; 16: 257.
13. Guderian RH, Sandoval CA, MacKenzie CD. Cryptosporidiosis in Equatorian children with acute diarrhea. *J Trop Pediat* 1986; 32: 290.
14. Shahid NS, Rahman ASM, Anderson BC. Cryptosporidiosis in Bangladesh. *Br Med J* 1985; 290: 114-115.
15. Blagburn RS, Kelsey P, Perrone T, Dickersin R, Laquarglia M, Ferruci J. Cytomegalovirus and *Cryptosporidium* associated a calculous gangrenous cholecystitis. *Am J Med* 1984; 76: 1118-23.
16. Brady EM, Margolis ML, Korzeniowski DH. Pulmonary cryptosporidiosis in AIDS. *JAMA* 1984; 252: 89-90.
17. Current WL. Human cryptosporidiosis. *N Engl J Med* 1983; 309: 1326-7.

important d'oocystes. En raison de sa capacité à différencier une bordure en brosse, cette lignée, proche de la cellule naturellement infestée, semble être un modèle d'étude intéressant.

Applications

Évaluation *in vitro* de l'efficacité de molécules sur *Cryptosporidium sp* [27]. Le choix des molécules testées est réalisé en fonction de leur activité partielle chez l'homme ou chez l'animal. La spiramycine est la première molécule à montrer quelques effets sur la cryptosporidiose humaine [28]. L'évaluation *in vitro* de l'activité de cette molécule sur *Cryptosporidium* permet la mise au point d'une méthode de criblage primaire de molécules potentiellement actives sur *Cryptosporidium sp*. Nos résultats démontrent cependant que, *in vitro*, aucune efficacité de la spiramycine sur l'ensemble des stades de développement du parasite ne peut être mise en évidence, alors même que la pénétration intracellulaire de l'antibiotique apparaît satisfaisante (figure 2, p. 766). Nous n'avons pas été plus heureux avec d'autres molécules testées dans les mêmes conditions: eflornithine, méfloquine, pentamidine, méfloxacine, péfloxacine, imipénème.

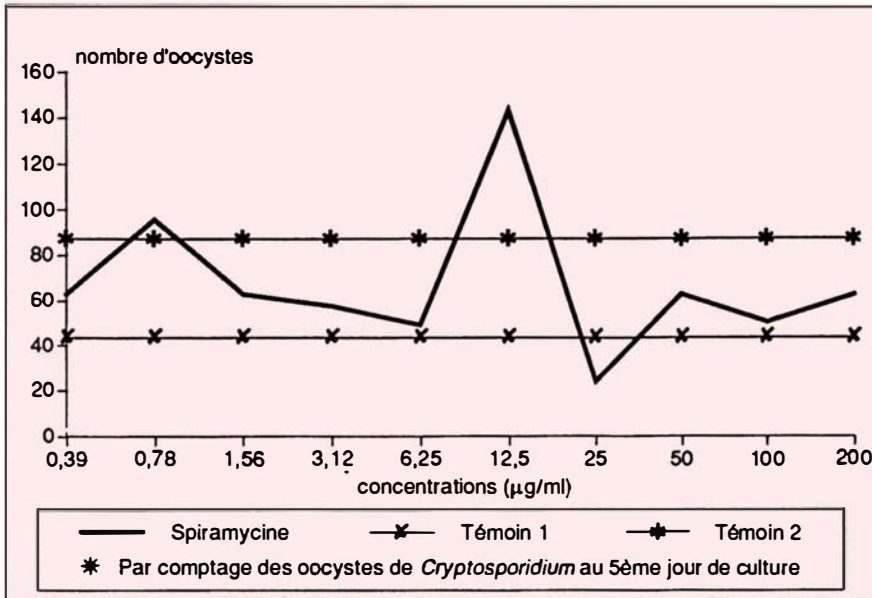


Figure 2. **Évaluation de l'activité in vitro de la spiramycine sur *Cryptosporidium****.

Conclusion

Le développement de *Cryptosporidium* sur entérocytes *in vitro* offre aux expérimentateurs un excellent modèle expérimental puisqu'il s'agit de la localisation habituelle du parasite chez l'homme. Il permet l'étude de molécules potentiellement actives sur *Cryptosporidium*, mais aussi l'obtention d'ocystes purifiés, source d'antigènes commodes pour affiner les techniques sérologiques actuelles. Enfin, la réussite de ce cycle *in vitro* pourra peut-être élucider le mécanisme intime entre le parasite et la cellule hôte, éclaircir la physiopathologie de la diarrhée cholériforme des patients atteints du SIDA et définir avec exactitude le cycle de ce protozoaire ■

RÉFÉRENCES

- Anderson BC, Donnedelinger T, Wilkins MR, Smith J. Cryptosporidiosis in a veterinary student. *JAMA* 1980 ; 182 : 408-9.
- Blagburn B, Current WL. Accidental infection of a researcher with human *Cryptosporidium*. *J Infect Dis* 1983 ; 148 : 772-773.
- Rush BA, Chapman PP, Ineson RW. *Cryptosporidium* and drinking water. *Lancet* 1987 ; i : 632-3.
- Hart A, Baxby D. Management of Cryptosporidiosis. *J Antimicrob Chemother* 1985 ; 15 : 3-4.
- Soave R. Therapy and prevention of coccidiosis. In : Leive L, Schlessenger D, eds. *Microbiology*. Washington : Am Soc Microbiol 1984 ; 232.
- Anderson BC. Most heat inactivation of *Cryptosporidium* sp. *Am J Pub Health* 1985 ; 75 : 1433-4.
- Current WL, Long PL. Development of human and calf *Cryptosporidium* in chicken embryos. *J Infect Dis* 1983 ; 148 : 1108-13.
- Current WL, Haynes TH. Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. *Science* 1984 ; 224 : 603-5.
- Datry A, Bretagne S, Zweibaum A, Melouck S, Mazier D, Monjour L. Complete development of *Cryptosporidium*. Second International Conference on Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). Paris, 1986.
- Datry A, Brandicourt O, Bellane C, Pajot N, Morin C, Danis M, Gentilini M. Effects of drugs on *Cryptosporidium* in cell culture *in vitro*. IVth International Conference on AIDS. Stockholm, 1988.
- Portnoy D, Whiteside ME, Buckley E, MacLeod CL. Treatment of intestinal cryptosporidiosis with spiramycin. *Ann Intern Med* 1984 ; 101 : 202-204.