MISE AU POINT D'UN MODÈLE EXPÉRIMENTAL DE CULTURE *IN VITRO* DES STADES ASEXUÉS DE *CRYPTOSPORIDIUM* SP.

A. BONNIN*, I. SALIMBENI*, J. F. DUBREMETZ**, G. HARLY***, P. CHAVANET****, P. CAMERLYNCK*

RÉSUMÉ

Une culture de cellules de tumeur d'intestin grêle de rat (lignée LGA) infectée par des sporozoïtes de *Cryptosporidium* sp. obtenus après excystation d'oocystes purifiés à partir de matières fécales

humaines ou bovines permet d'obtenir un développement asexué du parasite. Dès la 10^e heure des schizontes mûrs de première génération sont observés en microscopie photonique et électronique.

SUMMARY: *In vitro* development of asexual stages of *Cryptosporidium* sp. in cell culture.

Development of asexual stages of *Cryptosporidium* sp. was achieved in LGA cells (derived from a carcinoma of the small intestine in Lewis rats) with sporozoites excysted from oocysts

purified from human or bovine feces. Mature type I schizonts were observed 10 hours after inoculation by photonic and electronic microscopy.

Nous avons développé un modèle de culture *in vitro* de *Cryptosporidium* sp. qui permet d'obtenir la phase asexuée du cycle du parasite.

Javel du commerce à 12,5 % diluée au 1/6 dans de l'eau distillée, puis lavés 3 ou 4 fois par centrifugation dans de l'eau distillée stérile.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 — Lignée cellulaire

Les cellules utilisées appartiennent à une lignée continue de tumeur d'intestin grêle de rat Lewis (lignée LGA. Professeur F. Martin, INSERM U252, Dijon (5)). Elles ont été cultivées dans du milieu F₁₀ de Ham additionné de sérum de veau fœtal (10 %), de pénicilline (100 ui/ml), streptomycine (100 µg/ml) et de glutamine (2 mM), dans une étuve à 37° C à bouchon fermé. Le tapis cellulaire confluent a été trypsiné (Trypsine Mérieux à 0,25 % dans une solution d'EDTA disodique au 1/5000) et les cellules ont été réparties à raison d'environ 40 000/cm² sur des lamelles de verre de 2 cm².

2 — Purification des oocystes

Les cryptosporidies ont été isolées de matières fécales humaines ou bovines obtenues au cours d'infections naturelles et stockées à + 4° C dans du bichromate de potassium à 2,5 % jusqu'à 9 mois. Après flottation dans de l'eau distillée saturée en chlorure de sodium les oocystes ont été repris dans une solution d'eau de

3 — Excystation

Les oocystes purifiés ont été incubés 60 à 90 minutes à 37° C dans une solution de taurocholate de sodium à 0,04 % dans du milieu F₁₀ de Ham. En fin d'incubation la solution contenant des sporozoïtes libres, des oocystes intacts et des coques vides a été centrifugée (1 700 g) et le culot a été repris dans le milieu de culture sans antibiotiques sous un volume permettant de déposer environ 200 000 sporozoïtes dans 0,5 ml sur un tapis cellulaire confluent de 2 cm².

4 — Culture

Les cellules inoculées ont été cultivées à 37° C sous atmosphère enrichie en CO₂ (5 %). Quatre heures après le dépôt des sporozoïtes le milieu a été renouvelé après lavage préalable du tapis cellulaire 3 fois consécutives au PBS stérile. Par la suite le milieu de culture a été renouvelé 2 fois par jour.

5 — Microscopie photonique

Les cultures ont été fixées 5 minutes au méthanol puis colorées au Giemsa et examinées au grossissement × 1 000 comparativement à des cultures témoins non inoculées.

6 — Microscopie électronique

Les cultures réalisées sur lamelles Thermanox ont été fixées pendant 48 heures par le glutaraldéhyde à 2,5 % dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4, puis rincées par le tampon et fixées pendant 2 h dans le tétraoxyde d'osmium à 1 % dans le même tampon. La déshydratation a été réalisée en éthanol et a été suivie d'une inclusion en Epon. La couche monocellulaire ainsi incluse a ensuite été décollée de la lamelle plastique et les coupes ultra-

* Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, C.H.R., Hôpital du Bocage, 2, boulevard Maréchal-de Lattre-de-Tassigny, F 21034 Dijon.

** INSERM U42, Villeneuve-d'Ascq, France.

*** Direction des Services Vétérinaires, Dijon, France.

**** Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, C.H.R. Dijon, France.

Accepté le : 17 octobre 1989.

fines ont été réalisées sur ultramicrotome Reichert ultracut E. Les coupes ont été contrastées à l'acétate d'Uranyle, Citrate de Plomb et observées avec un microscope électronique Hitachi H600.

RÉSULTATS

— Jusqu'à la 9^e heure après inoculation nous n'avons décelé que des éléments parasitaires uninucléés, arrondis ou ovalaires (fig. 1a) dont la taille atteint 3, 4 μ m.

— A la 10^e heure sont apparus des éléments à 2 et 4 noyaux (fig. 1b) et de très rares schizontes à 8 noyaux (fig. 1c) dont la taille atteint 5,2 μ m.

— La proportion d'éléments multinucléés et particulièrement de schizontes à 8 noyaux a augmenté et semblé maximale entre la 18^e et la 20^e heure. Le ratio s'est inversé à la 21^e heure au profit des éléments mononucléés.

— Tous les stades à 1, 2, 4 et 8 noyaux ont été retrouvés

de la 24^e heure jusqu'au 4^e jour postinoculation. Aucun élément parasite n'a été retrouvé après le 5^e jour. Aucune production d'oocyste n'a été observée. Cent cinquante à 300 schizontes à 4 et 8 noyaux ont été comptés à la 15^e heure sur 2 diamètres perpendiculaires d'une culture confluyente de 2 cm².

L'étude en microscopie électronique d'un tapis cellulaire fixé à la 14^e heure post-inoculation a confirmé la présence de parasites à différents stades de maturation y compris de schizontes matures de 1^{re} génération contenant 8 mérozoïtes (fig. 2).

Ce modèle a été utilisé de manière reproductible jusqu'à ce jour à partir de différentes souches de *Cryptosporidium* sp. d'origine humaine (2 souches) bovines (8 souches) ou d'agneau (1 souche). L'une des souches humaines a permis d'obtenir régulièrement le cycle schizogonique jusqu'au 9^e mois de conservation des matières fécales à + 4° C.

DISCUSSION

Le cycle évolutif complet *Cryptosporidium* sp. en culture *in vitro* a été rapporté par Current et Haynes sur cellules de poumon fœtal humain (2), par Bretagne et coll. sur cellules de tumeur colique humaine (1) et par Naciri et coll. avec *Cryptosporidium muris* sur cellules de rein de hamster nouveau-né (6). Cependant la difficulté d'identification de certains éléments parasitaires observés en contraste interférentiel ou après coloration des cultures a été soulignée par Lindsay et coll. (4). Dans le modèle que nous présentons la mise en évidence en microscopie électronique de schizontes à 8 noyaux permet d'affirmer l'existence d'au moins une génération schizogonique.

L'inversion du rapport entre éléments multinucléés et éléments mononucléés entre la 18^e et la 21^e heure semble indiquer que l'éclatement de la majorité des schizontes mûrs de première génération a lieu entre la 18^e et la 21^e heure. La présence d'éléments parasitaires à différents stades après la 24^e heure peut être due à une seconde génération schizogonique. Ceci ne peut toutefois pas rendre compte de la persistance tardive d'éléments à 8 noyaux car les schizontes mûrs de seconde génération ne contiennent que 4 mérozoïtes. Deux autres hypothèses, une multiplication asynchrone des différents parasites en culture, ou la répétition d'un cycle de première génération peuvent expliquer cette persistance. Un développement cyclique à partir des schizontes de première génération a d'ailleurs été mis en évidence *in vivo* chez la souris (3). La chronologie d'apparition des stades asexués dans notre modèle est proche de celle rapportée par Current et Haynes (2) puisque ces auteurs observent l'apparition de schizontes mûrs de première génération entre la 8^e et la 12^e heure, celle de schizontes mûrs de seconde génération entre la 16^e et la 24^e heure et la persistance de schizontes mûrs de première génération jusqu'au 4^e jour.

FIG. 1. — Stades asexués de *Cryptosporidium* sp. en culture *in vitro* (a : éléments mononucléés, b : schizonte à 4 noyaux, c : schizonte à 8 noyaux).

FIG. 2. — Schizonte mature de *Cryptosporidium* obtenu en culture *in vitro* (m : micronèmes, r : rhoptrie, n : noyau) $\times 35\,000$.

Si les données de la microscopie électronique nous permettent d'affirmer le déroulement d'un cycle schizogonique, l'existence d'un cycle sexué est en revanche très improbable. Après inoculation, des oocystes non excystés et des coques vides restent en effet collées au tapis cellulaire et en nombre très variable en fonction du soin apporté aux lavages. Dès lors, dans nos conditions expérimentales, il est impossible d'affirmer que les oocystes observés au cours de cultures résultent bien d'un cycle sexué.

CONCLUSION

Ce nouveau modèle de culture *in vitro* est en cours d'application pour tester l'activité pharmacologique potentielle de différentes molécules sur la phase asexuée du cycle de *Cryptosporidium* sp. Il permettra également de préciser l'importance éventuelle de certains déterminants antigéniques du sporozoïte à partir d'anticorps monoclonaux. Un anticorps monoclonal dirigé contre le sporozoïte de *Cryptosporidium* sp. a été sélectionné dans notre laboratoire. L'association d'un tel modèle de culture *in vitro* et d'anticorps monoclonaux devrait permettre d'étudier l'interaction du parasite et de la cellule-hôte chez cette coccidie à la biologie si particulière.

Remerciements. — Les auteurs expriment toute leur gratitude à Monsieur le Professeur F. MARTIN et à son équipe qui ont bien voulu leur confier la lignée cellulaire LGA, à Monsieur le Professeur J. P. Zahnd qui a réalisé certaines des photographies, et à Monsieur le Professeur Pothier pour son soutien technique.

Ce travail a bénéficié du soutien financier de l'INSERM (Programme national de recherche sur le SIDA, PNRS, 1987, 1988).

RÉFÉRENCES

1. Bretagne S., Datry A., Zweibaum A., Mazier D., Monjour L., Gentilini M. : Culture cellulaire de *Cryptosporidium* sp. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 1985, 2, 51-54.
2. Current W. L., Haynes T. B. : Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. *Science*, 1984, 224, 603-605.
3. Current W. L., Reese N. C. : A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *J. Protozool.*, 1986, 33, 98-108.
4. Lindsay D. S., Sundermann C. A., Blagburn B. L. : Cultivation of *Cryptosporidium baileyi*: studies with cell cultures, avian embryos, and pathogenicity of chicken-embryo-passaged oocysts. *J. Parasitol.*, 1988, 74, 288-293.
5. Martin M. S., Bastien H., Martin F., Michiels R., Martin M. R., Justrabo E. : Transplantation of intestinal carcinoma in inbred rats. *Biomedicine*, 1973, 19, 555-558.
6. Naciri M., Yvore P., Boissieu de C., Esnault E. : Multiplication de *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907) *in vitro*. Entretien d'une souche sur œufs embryonnés. *Rec. Med. Vet.*, 1986, 162, 51-56.