

Thèse de doctorat

Développement d'un modèle de culture
tridimensionnelle à partir d'explants entériques
pour l'étude de la cryptosporidiose

Martha BAYDOUN

30/01/2018

L'école doctorale Sciences pour l'Ingénieur

Spécialité Micro Nanosystèmes et Capteurs

Devant le jury d'examen

Rapporteurs	Loic Favennec Benoit Charlot	PUPH CHU Rouen CR CNRS HDR IES Montpellier
Examineurs	Hicham El Alaoui Lionel Buchaillot	MCFHDR CHU Clermont Auvergne DR CNRS IEMN
Directeurs de thèse	Vincent Senez Gabriela Certad	DR CNRS IEMN MD, PhD, HDR FMM, ICL Lille
Invités	Nathalie Maubon Jérôme Follet Sadia Benamrouz	CEO HCS Pharma, PhD HCS PHARMA, Lille MCF YNCREA Lille MCF FGES, ICL Lille

Pour mes Pères au ciel, Maman et Atallah

« Au commencement était la Parole, et la Parole était avec Dieu, et la Parole était Dieu.

Elle était au commencement avec Dieu.

Toutes choses ont été faites par elle, et rien de ce qui a été fait n'a été fait sans elle.

En elle était la vie, et la vie était la lumière des hommes.

Cette lumière était la véritable lumière, qui, en venant dans le monde, éclaire tout homme »

Elle était dans le monde, et le monde a été fait par elle, et le monde ne l'a point connue

Remerciements

Ce projet de thèse a été soutenu financièrement par la région “Hauts-de-France”, la “Métropole Européenne de Lille”, l’Université Catholique de Lille, l’Institut Pasteur de Lille, le Centre National de la Recherche Scientifique et l’Université de Lille.

Je remercie le Conseil de Recherche de l’Université Catholique de Lille pour leur soutien financier qui m’a permis de participer à deux congrès internationaux et terminer ma thèse dans la sérénité.

Aux membres du jury :

Au Professeur Loic Favennec et au Docteur Benoit Charlot

Je vous remercie de m’avoir fait l’honneur d’être dans mon jury de thèse et d’avoir accepté de partager votre savoir ainsi que votre expérience pour évaluer ce travail de thèse.

Aux Docteurs Hicham El-Alaoui et Lionel Buchaillet

Je vous remercie d’avoir accepté de consacrer un peu de votre temps si précieux pour juger mon travail. Soyez assurés de ma profonde reconnaissance.

Au Docteur Nathalie Maubon

Pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Au Docteur Vincent Senez

Pour avoir accepté de prendre la direction de ma thèse. Grâce à cette expérience, j’en sors plus forte et plus confiante.

Au Docteur Gabriela Certad

Ma co-directrice, je te suis très profondément reconnaissante pour tout ce que tu as fait pour moi. La rigueur scientifique dont tu fais preuve est pour moi une source d’inspiration. Tu étais la sérénité dans ma tempête de thèse et tu as pu faire de mes essais de rédaction, des articles soumis et acceptés.

Au Docteur Jérôme Follet

Mon co-encadrant, pour avoir accepté ma candidature de thèse, pour toutes les démarches administratives entamées lors du dépôt du projet de thèse et pour son implication dans ce travail.

Au Docteur Sadia Benamrouz

Ma co-encadrante. Je n’ose même pas imaginer le déroulement de ma thèse sans toi. Ton assiduité et ta passion pour la recherche m’ont été essentielles au cours de ma thèse. Bien plus qu’une co-encadrante, tu as été un véritable soutien sur tous les plans. Je te suis aussi profondément reconnaissante d’avoir fait passer ma thèse et ma santé en priorité. Tu as toujours cru en moi et en ce projet, même lorsque je n’y croyais plus.

Aux labos :

Grâce à mon sujet transdisciplinaire, j'ai pu côtoyer plusieurs équipes de recherche. Je commence par adresser mes remerciements au Laboratoire BDPEE de l'Institut Pasteur de Lille. J'ai eu la chance d'être accueillie dans cette équipe qui a pu supporter (avec un sourire) mes chansons, mon caractère et mes nombreux délires.

Pour le directeur du laboratoire le « CHEF » Dr. Eric Viscogliosi, je tiens à t'adresser mon entière gratitude. Tu as toujours été là pour apporter tes connaissances, ton expérience et ton humour. Tu as fais de ton mieux pour que je puisse soutenir dans les meilleures conditions. J'espère être à la hauteur de tes attentes pour ma future carrière dans la recherche. Je te serais à jamais reconnaissante.

A présent, je souhaite adresser mes remerciements au Dr. Magali Chabé dont la vivacité intellectuelle est source d'inspiration. Merci d'avoir toujours été prête à répondre à mes questions. Je tiens à également à remercier du fond du cœur la pratique et la pragmatique Nausicaa Gantois. Merci pour ton humour (hors du commun) et pour ton soutien quotidien. Je remercie Karine Guyot pour tes conseils qui ont été primordiaux pour la réussite des manips et des qPCR de dernière minute. J'adresse mes remerciements à mes collègues de bureau. Faut l'avouer ce n'est pas facile de partager un bureau avec moi mais Dr. Dionigia Meloni et Stéphanie Greige l'ont fait avec un grand sourire. Meloniette, je n'oublierai jamais mes rires avec toi et tes conseils qui m'ont apporté du réconfort dans les périodes les plus difficiles. Merci Stéphanie pour avoir apporté un peu de mon pays avec toi. Je te souhaite bon courage pour ta dernière année de thèse. Enfin, je remercie toutes les personnes que j'ai rencontrées à Pasteur, l'équipe BioPuces, Christophe Audebert, Olivia, Linh, Erika, tout le personnel de l'animalerie et le personnel administratif pour leur aide et leur support précieux.

Le deuxième groupe de recherche dont je faisais partie est le groupe BioMEMS de l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologies (IEMN). Je souhaite adresser mes remerciements à toute l'équipe dirigée par Dr Vincent Thomy. Merci de m'avoir apporté votre soutien inconditionnel jusqu'à la fin de la thèse. J'ai une gratitude particulière pour le Dr Anthony Treizebré. La partie microfluidique n'aurait jamais vu le jour si tu ne t'étais pas autant investi. Merci pour ta disponibilité et tes conseils qui ont été primordiaux pour le bon déroulement de cette partie du projet de thèse. Un grand merci à toute l'équipe de BANANA TEAM, plus particulièrement Tiffany, Léanna, Justine et Ugo. Merci pour le soutien moral que vous m'avez apporté, merci d'être toujours à l'écoute, merci pour nos rires et souvenirs. Les journées longues à l'IEMN ont été supportables grâce à vous. J'intègre également dans les remerciements, Dr. Céline Vivien pour sa sagesse, Dr. Alexis Vlandas pour ses connaissances hors du commun, Dr. Caroline D pour sa bonne humeur et Dr. Alfred D pour ses conseils. J'adresse mes remerciements à Norah et à toute l'équipe administrative de l'IEMN.

J'adresse également mes remerciements au troisième groupe de recherche dont j'ai fait partie, l'équipe BioGAP ISA-YNCREA Hauts-de-France. Je remercie le Dr. Patrice Halama qui m'a accueilli et soutenu tout le long de ma thèse. Je n'oublie pas Dr. Ali S, Dr. Bertrand V, Dr. Sitraka A, Dr. Caroline C, Caroline D, Dr. Jérôme M et Ourida H. Je remercie Samara Mejri, nous avons commencé la thèse ensemble et nous avons créé une amitié qui je l'espère continuera bien après la thèse. J'adresse aussi mes remerciements à Sandrine T et Guislaine D pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Je remercie également Prof Creusy pour son apport considérable dans ce projet de thèse. J'adresse mes remerciements à Baptiste qui a toujours priorisé mes explants de 12 mm² invisible dans un bloc de paraffine. Je remercie Prof Gosset et toute l'équipe anapath de l'hôpital Saint Vincent de Paul.

Cependant, je ne serais pas arrivé à faire une thèse sans le soutien, les sacrifices et les prières de nombreuses personnes dans ma vie. Je commence par mes amis et les membres de ma famille : Tony B, tante Marie, Laura, Nadine, Jad, Doumet, Michel K, Abdallah, Jija et Patricia. Malgré la distance, vous avez fait preuve d'un soutien inconditionnel. J'ai hâte de célébrer le reste de notre vie ensemble. Vous avez d'une façon ou d'une autre contribué à ma réussite.

Je remercie mon copain Abdo. T'avoir dans ma vie est un cadeau parfait. Nous avons vécu ensemble cette aventure, avec ses hauts et ses bas. Tu as été ma force quand j'étais faible. La vie n'est pas toujours rose, mais peu importe je la vivrai avec toi.

Je remercie Père Pandilaimon et mon parrain spirituel Frère Payesios. Les mots ne suffisent pas pour décrire l'effet que vos prières et vos conseils ont sur ma vie et surtout pendant les périodes difficiles. Je compterai toujours sur vous. Finalement, si Dieu est pour nous, qui sera contre nous ? Je remercie Jeannette, le soldat silencieux. Merci pour ton amour inconditionnel et tes prières. Merci de m'envoyer des messages tous les matins et de m'apporter ton encouragement quotidien.

Pour finir, je remercie ma mère. Si le bon Dieu m'avait donné un papa plus digne du ciel que de la terre, il m'avait laissé sur terre un ange que j'ai la chance d'appeler maman. Sainte Rita (ta complice) et toi, vous êtes la source de toute réussite et joie. A mon frère, Atallah, j'adresse tous les remerciements. Jamais je ne serais arrivée là sans toi. Tout le bien dans cette vie, et celle d'après, émane de toi. Dans tous mes rêves, dans toutes mes réussites dans toutes mes joies tu es présent. Atallah, il me suffit de te parler pour entendre dans ta voix l'amour de mon père et de Dieu. Merci.

Sommaire

I.	Résumé.....	6
II.	Abstract.....	7
III.	Introduction.....	8
IV.	<i>Cryptosporidium</i>	10
1	Généralités	10
1,1	Découverte de <i>Cryptosporidium</i>	10
1,2	Le cycle biologique du parasite	12
1,3	Position taxonomique de <i>Cryptosporidium</i>	14
1,4	<i>Cryptosporidium</i> , une grégarine ?	16
2	La cryptosporidiose.....	17
2,1	Facteurs de risque	18
2,2	Processus cellulaire épithélial initié après infection par <i>Cryptosporidium</i>	19
2,3	Modalités de transmission	22
2,1	Mesures de contrôle.....	22
2,2	Traitement.....	23
3	<i>Cryptosporidium</i> et Cancer	23
3,1	Eléments cliniques montrant une association entre la pathologie cancéreuse et l'infection à <i>Cryptosporidium</i>	24
3,2	Preuves expérimentales de l'association entre <i>Cryptosporidium</i> et le cancer digestif.....	26
4	<i>Cryptosporidium</i> , modèles d'étude	29
4,1	Modèles animaux.....	29
4,2	Méthodes de Culture de <i>Cryptosporidium</i>	32
V.	La microfluidique.....	55
1	Petites dimensions compatibles avec l'échelle de l' <i>in vivo</i>	57
2	Organisation dans l'espace de différents types cellulaires	57
3	Notions de création de gradient	58
4	Notions de contrainte de cisaillement	60
5	Facilité de l'analyse fonctionnelle	60
6	Les applications microfluidiques dans la culture 3D	62
6,1	Création d'un tissu biologique structuré à partir de cellules adhérentes remises en suspension	62
6,2	Culture d'organoïdes en systèmes microfluidiques.....	64

6,3	Culture d'organes en systèmes microfluidiques	66
VI.	Objectifs, stratégies et résultats.....	68
	Objectifs.....	68
	Stratégies.....	68
	Résultats.....	70
	Article 2 : Haute association entre l'infection par <i>Cryptosporidium</i> spp et le cancer colorectal chez des patients libanais	70
	Article 3 : Développement d'un système de culture 3D à partir d'explants entériques murins pour l'étude de la cryptosporidiose.....	87
	Article 4 : Développement d'un dispositif de culture 3D microfluidique à partir d'explants entériques murins.	111
VII.	Discussion.....	123
	Axe1: Etude du rôle de <i>Cryptosporidium</i> dans le développement de cancer digestif chez l'Homme.	123
	Axe 2: Le développement d'un système de culture 3D pour l'étude de la cryptosporidiose.	126
	Axe 3: Développement d'un dispositif microfluidique pour la culture d'explants entériques.	130
VIII.	Conclusions et perspectives	133
IX.	Références.....	136
X.	Annexes.....	154

Sommaire des figures

Figure IV-1 Oocyste et sporozoïtes en cours de désenkystement	11
Figure IV-2 Cycle biologique de <i>Cryptosporidium</i>	13
Figure IV-3 Mécanismes de défense des cellules épithéliales après infection par <i>C. parvum</i>	21
Figure IV-4 Modèle expérimental de souris SCID-D infectées par <i>C. parvum</i>	27
Figure IV-5 Détection de la localisation de la B-caténine	29
Figure V-1 Comparaison entre les microenvironnement dans une culture 2D et une culture 3D	59
Figure V-3 Chronologie des développements révolutionnaires qui ont contribué à la mise en place de culture 3D sur dispositif microfluidique	63
Figure V-4 Différents types de culture d'organes sur dispositif microfluidique.....	64
Figure V-5 Schéma d'un dispositif de culture d'organoides	65
Figure V-6 Schémas du système de culture d'intestins de souris	67
Figure V-7 Schéma d'ensemble du système de culture d'intestin de souris.....	67

Sommaire des tableaux

Tableau IV-1 Taxonomie de <i>Cryptosporidium</i> : une coccidie atypique.....	15
Tableau IV-2 Espèces de <i>Cryptosporidium</i> pouvant infecter l'Homme	17

Liste des abréviations

APTES :	Aminopropyl-triethoxysilane
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADNr :	Acide désoxyribonucléique ribosomal
ANOFEL:	Association française des enseignants et praticiens hospitaliers titulaires de parasitologie et mycologie médicale
APC :	Adenomatous Polyposis Coli
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
BALB :	Bagg Albino
Cae:	Caecum
CACO 2:	Cellules épithéliales humaines
CCR:	Cancer colorectal
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
<i>C. parvum</i> :	<i>Cryptosporidium parvum</i>
<i>C. muris</i> :	<i>Cryptosporidium muris</i>
<i>C. hominis</i> :	<i>Cryptosporidium hominis</i>
<i>C. meleagridis</i> :	<i>Cryptosporidium meleagridis</i>
<i>C. cuniculus</i> :	<i>Cryptosporidium cuniculus</i>
<i>C. andersoni</i> :	<i>Cryptosporidium andersoni</i>
<i>C. felis</i> :	<i>Cryptosporidium felis</i>
<i>C. canis</i> :	<i>Cryptosporidium canis</i>
CDC42 :	Cell division control protein 42
CO2 :	Dioxyde de Carbone
Dex :	Dexaméthasone
ELISA :	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
GTPase :	Quanosine Triphosphate catalase
HAART :	Highly active antiretroviral therapy ; Traitement antirétroviral hautement actif
HRT :	Human rectal tumor
HT29.74 :	Cellules humaines de carcinome du colon

IEC :	Cellules épithéliales intestinales
IFN :	Interféron
IL2 :	Interleukine 2
IMS :	Immunomagnetic separation ; Séparation immunomagnétique
KGF :	Keratinocyte growth factor
MET:	Microscopie électronique à transmission
NFκB :	Facteur nucléaire κB
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PCR :	Réaction en chaîne par polymérase
PI :	Post infection
PI3K:	Phosphatidyl inositol 3- kinase
PBS :	Phosphate-buffered saline
P53 :	Protéine anti-oncogène
PDMS :	Polidiméthylsiloxane
PCR :	Polymerase chain reaction
rRNA :	Ribosomal ribonucleic acid ; Acide ribonucléique ribosomal
SCID :	Severe combined immunodeficiency (sans traitement à la dexaméthasone)
SCID-D :	Severe combined immunodeficiency (avec traitement à la dexaméthasone)
SIDA :	Syndrome de l'immunodéficience acquise
3D :	Tridimensionnelle
VHB :	Virus de l'hépatite B
VHC :	Virus de l'hépatite C
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine
Wnt :	Famille de glycoprotéines jouant un rôle dans l'embryogenèse et le développement de cancer
UV :	Ultraviolet

I. Résumé

Plus de 20 % des cancers sont dus à une infection virale, bactérienne ou parasitaire. On cite, à cet égard, le parasite *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) qui est capable d'induire, chez des souris immunodéprimées traitées ou non par des corticoïdes, le développement d'adénocarcinomes invasifs au niveau gastro-intestinal. Cependant, la compréhension de la pathogénicité de *Cryptosporidium* a été limitée par l'absence d'un système de culture en continu et à long terme. Il est donc indispensable d'améliorer les systèmes de culture *in vitro* en mimant le plus possible les conditions de l'*in vivo*.

C'est pourquoi, j'ai participé tout d'abord à la réalisation d'une étude épidémiologique sur plusieurs groupes de patients Libanais atteints ou non de néoplasies/adénocarcinomes digestifs. Ce qui a permis de mettre en évidence que le taux d'infection à *Cryptosporidium* était significativement plus élevé chez les patients atteints de cancers coliques comparativement aux autres groupes de patients. Offrant ainsi de nouveaux arguments en faveur d'un lien entre l'infection à *Cryptosporidium* et la pathologie cancéreuse chez l'homme.

Ensuite, j'ai travaillé au développement d'un modèle de culture tridimensionnelle (3D) à partir d'un côlon murin adulte. Ce système a non seulement permis le maintien de l'infection pendant plus d'un mois mais plus important encore, il a permis de mettre en évidence le développement *in vitro* de lésions néoplasiques dès 27 jours post infection. Il s'agit, de la première description d'une induction de néoplasies intraépithéliales de bas grade dans un système de culture 3D, par un parasite. Enfin, afin d'automatiser ce système, j'y ai associé un dispositif de microfluidique. Ce dernier a permis le maintien de la culture pendant près de 8 jours. Ce qui est à notre connaissance, la première description d'une culture tissulaire d'intestin sur un dispositif microfluidique viable sur une durée aussi longue.

Mots clés : *Cryptosporidium*, cancer colorectal, culture tridimensionnelle, explant, cinétique de l'infection, interaction hôte-parasite, néoplasie, microfluidique, automatisation.

II. Abstract

It is well known that 20% of cancers are due to a viral, bacterial or parasitic infection. For instance, *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) was found to induce the development of invasive digestive adenocarcinomas in an experimental model of SCID mice treated or not with dexamethasone.

However, the understanding of the pathogenesis of *Cryptosporidium* has been limited by the lack of an easy long-term culture system. It is therefore essential to improve the *in vitro* culture systems by trying to mimic the conditions of the *in vivo* environment.

In the first part of this work, the association between *Cryptosporidium* infection and the development of cancer was investigated through an epidemiological study among cohorts of Lebanese patients with or without recent diagnosis of digestive cancer before any treatment. A high rate of *Cryptosporidium* was detected in biopsies from Lebanese patients with digestive neoplasia/adenocarcinoma recently diagnosed. These results showed that *Cryptosporidium* was strongly associated with human colon cancer being maybe a potential etiological agent of this disease.

In the second part of this work, a three dimensional (3D) *Cryptosporidium* culture model was developed from adult murine colon. Strikingly, the resulting system allowed the reproduction of neoplastic lesions *in vitro* at 27 days post-infection, providing new evidence of the role of the parasite in the induction of carcinogenesis. To our knowledge, this is the first description of a low-grade intraepithelial neoplasia induction after parasite infection in a 3D culture method.

Finally, in order to automatize the culture hence preventing any external damage or contamination, a microfluidics device for explant culture was designed. Indeed, an explant culture was maintained for almost 8 days using this microfluidic device. To our knowledge, this is the first description of a gut tissue culture on a microfluidic device that was viable for 8 days.

Key words: *Cryptosporidium*, colorectal cancer, tridimensional culture, explant, kinetics of infection, neoplasia, host-parasite interaction, microfluidics, automatization.

III. Introduction

Les protozoaires du genre *Cryptosporidium* sont des parasites appartenant au phylum des Apicomplexa. Ces organismes ont comme caractéristique de posséder un complexe apical qui permet l'invasion et le développement du parasite au sein de la cellule hôte. Plus d'une trentaine d'espèces de *Cryptosporidium* ont été validées qui diffèrent par leur morphologie, leur génome et leur capacité à infecter différents vertébrés (Squire and Ryan, 2017).

Cryptosporidium est un parasite infectant le tractus gastro-intestinal de nombreux vertébrés et qui cible les cellules épithéliales. Cependant une dissémination extra-intestinale du parasite vers d'autres organes comme les poumons a pu être montrée (Leitch and He, 2012). Une infection par *Cryptosporidium* entraîne le développement d'une cryptosporidiose, maladie à transmission féco-orale dont la manifestation principale est une diarrhée. C'est dans les années 70 que *Cryptosporidium* a été décrit comme étant à l'origine de la cryptosporidiose chez l'Homme (Nime *et al.*, 1976). Aujourd'hui, des études épidémiologiques ont montré que 95% des cryptosporidioses détectées chez l'Homme sont dues aux espèces *C. hominis*, une espèce généralement inféodée à l'Homme ou *C. parvum*, une espèce zoonotique trouvée plus fréquemment chez les bovins (Ryan *et al.*, 2014). Cette maladie a été répertoriée sur tous les continents mais les pays en développement sont les plus touchés. Pourtant, plusieurs épidémies de cryptosporidiose ont été recensées ces dernières années dans des pays développés comme le montre l'étude de Yoder *et al.* réalisée en 2012 aux États-Unis (Yoder *et al.*, 2012).

De plus, il est aujourd'hui établi que l'infection par certains parasites entraîne le développement de cancer chez l'hôte. C'est notamment le cas des trématodes *Schistosoma haematobium*, agent de cancer vésical, *Clonorchis sinensis* et *Opisthorchis viverrini*, agents de cholangiocarcinome (Benamrouz *et al.*, 2012a). Au cours de ces dernières années, il a également été montré que deux protozoaires Apicomplexa pouvaient induire des transformations tumorales chez des mammifères : *Theileria*, qui induit une maladie lymphoproliférative chez les bovins (Cheeseman and Weitzman, 2017) et *Cryptosporidium* qui est à ce jour le seul protozoaire capable d'induire des cancers épithéliaux dans un modèle murin (Benamrouz *et al.*, 2012b; Certad *et al.*, 2007a). Egalement, plusieurs études épidémiologiques tendent à mettre en évidence une association entre l'infection à *Cryptosporidium* et la pathologie cancéreuse et plus particulièrement les cancers colorectaux (Izquierdo *et al.*, 1988; Sulzyc-Bielicka *et al.*, 2007). En 2007, Certad *et al.* ont pu montrer que *C. parvum* était doté d'un pouvoir carcinogène lui permettant d'induire des adénocarcinomes invasifs pouvant atteindre les couches les plus externes du tractus gastro-intestinal (région iléo-caecale,

estomac et voies biliaires), de souris SCID déficientes en lymphocytes T et B, traitées ou non par un glucocorticoïde, la dexaméthasone qui diminue la réponse immunitaire innée (Certad *et al.*, 2007a). Il s'agit de la première observation d'un adénocarcinome induit par un protozoaire chez un mammifère (Certad *et al.*, 2007a, 2010a, 2012). Il a également été montré qu'un seul parasite suffisait à induire non seulement une infection chronique chez les souris mais également l'apparition de lésions néoplasiques aussi bien dans la région antropylorique de l'estomac qu'au niveau de la région iléocœcale dès 45 jours après infection (Benamrouz *et al.*, 2012b).

Cependant, l'ensemble de ces travaux se heurte aux contraintes d'un modèle animal qui est complexe, coûteux et sujet à des questionnements éthiques. La culture *in vitro* traditionnelle, quant à elle, souffre d'une trop grande simplification puisque l'approche en culture cellulaire ne permet pas d'appréhender le mécanisme invasif impliqué lors du développement tumoral. D'autre part, la plupart des techniques de culture *in vitro* de *Cryptosporidium* utilisent des cellules cancéreuses (Karanis and Aldeyarbi, 2011) et sont limitées dans le temps (Arrowood, 2002). Plusieurs techniques ont été récemment développées (Karanis, 2017) dans le but d'améliorer les conditions de cultures *in vitro* de ce parasite en offrant un microenvironnement simulant l'*in vivo* pour une durée relativement importante. Dans ce contexte, ces techniques se présentent alors comme des approches alternatives pour l'étude des parasites du genre *Cryptosporidium* et de leur pouvoir pathogène. Développer un nouvel outil de culture *in vitro* pour réaliser ces études sur un modèle en trois dimensions permettrait d'appréhender les phénomènes et la cinétique d'apparition de la tumeur. En effet, l'architecture spécifique de l'*in vivo*, les interactions intercellulaires et les relations liant les cellules à leur microenvironnement extérieur ne sont pas reproduites dans une culture en monocouche sur du plastique ou du verre (Weigelt *et al.*, 2014). Dans cette optique, ma thèse avait pour objectifs de :

- Etudier la pathogénicité de *Cryptosporidium* en mettant en évidence une association entre le développement d'un cancer colique chez l'Homme et l'infection par le parasite
- Mettre au point un nouveau modèle de culture 3D *in vitro* de parasites du genre *Cryptosporidium* basée sur des explants entériques murins

D'autre part, l'utilisation de systèmes microfluidiques pour créer des cultures 3D de tissus fonctionnels à partir de cellules est un domaine de recherche en pleine croissance. La technologie microfluidique a permis de mettre en place des dispositifs pour la co-culture (Bricks *et al.*, 2014; Maschmeyer *et al.*, 2015), la culture d'organoïdes (Agastin *et al.*, 2011; Isshiki *et al.*, 2017) la culture de biopsies (Fang *et al.*, 2010; Holton *et al.*, 2017) et la culture de tissus (Yissachar *et al.*, 2017). En effet, l'existence d'écoulement laminaire en continu dans des conditions dynamiques,

stériles et hautement contrôlables, permet un apport continu d'éléments nutritifs et le recyclage simultané du milieu de culture limitant de fait l'accumulation de déchets métaboliques. En outre, les dimensions, dans la gamme de la dizaine à la centaine de micromètres, de ces dispositifs microfluidiques sont compatibles avec celles de nombreuses microstructures et environnements *in vivo* (Miura and Yokokawa, 2016). Ainsi, grâce à la microfluidique, il est possible de créer des plateformes automatiques pour contrôler en temps réel l'apport de fluide, la création de gradient et de forces de cisaillement. Cependant, les données disponibles pour la culture d'explants entériques sont peu nombreuses et montrent que ces systèmes permettent de maintenir en culture l'explant sur des courtes périodes ne dépassant pas les quelques jours (Hattersley *et al.*, 2011; Yissachar *et al.*, 2017).

La culture à long terme, durant des semaines, de biopsies en microsystème est encore aujourd'hui un défi technologique et à ce titre au cœur de mon projet de thèse. En effet, après avoir déterminé les meilleures conditions pour la culture 3D en puits, mon objectif a été de développer et valider un dispositif microfluidique pour la culture d'explants entériques.

Aujourd'hui, il devient crucial de faire converger plusieurs domaines scientifiques afin de surmonter les difficultés techniques empêchant l'exploration de nouvelles questions biologiques. Ma thèse s'inscrit parfaitement dans cette optique transversale. En effet, mon travail de thèse se situe dans un environnement pluridisciplinaire et plus particulièrement dans un contexte regroupant l'ingénierie et la biologie. L'ensemble de ces approches méthodologiques visent à développer de nouveaux outils d'étude permettant d'appréhender et de comprendre les mécanismes d'induction d'un cancer par des parasites du genre *Cryptosporidium*.

IV. *Cryptosporidium*

1 Généralités

1,1 Découverte de *Cryptosporidium*

Plus d'un siècle s'est écoulé depuis qu'Ernest Edward Tyzzer, professeur de parasitologie médicale à l'Université de Harvard à Boston, a publié les premières descriptions de *Cryptosporidium* (Figure IV-1). Tyzzer nota alors la présence récurrente d'un parasite unicellulaire dans la muqueuse gastrique de souris (*Mus musculus*) qu'il nomma *Cryptosporidium muris*. Équipé d'un microscope optique, Tyzzer décrit un parasite localisé au pôle apical et attaché par une organelle à la cellule hôte. Il a pu ainsi caractériser un nouveau genre de protozoaires apparentés aux Coccidies, le genre *Cryptosporidium* (Tyzzer, 1910). Plus tard, en 1912, il observa une autre espèce dans l'intestin de la souris, qu'il nomma *Cryptosporidium parvum* (Fayer *et al.*, 2010). C'est en 1978 que la microscopie

électronique est parvenue à détecter l'existence des oocystes de *Cryptosporidium*, la forme de résistance et de dissémination du parasite (Pohlenz *et al.*, 1978).. Le mode de transmission de cette infection est oro-fécal. Les individus infectés excrètent des oocystes qui seront ingérés suite à un contact direct avec un hôte infecté ou de manière indirecte via la consommation d'eau ou d'aliments contaminés (Fayer *et al.*, 2010).

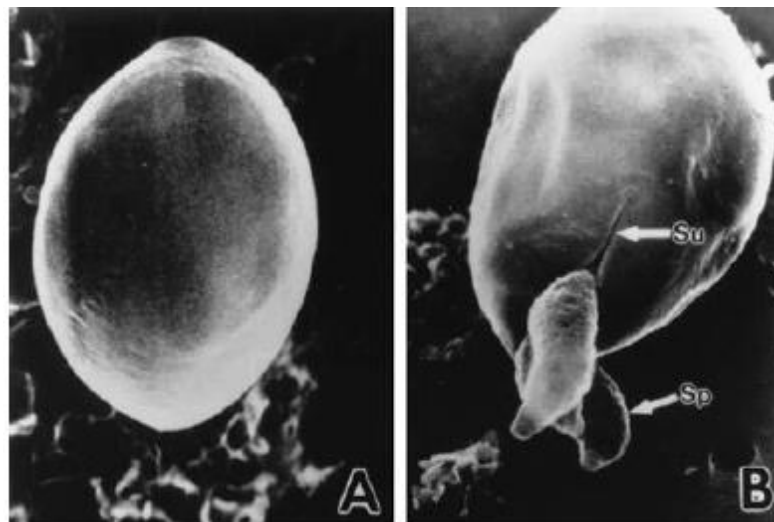


Figure IV-1Oocyste et sporozoites en cours de désenkystement (A) oocyste intact avant l'étape de désenkystement (B) libération de trois sporozoites (sp) par une fente (su) dans la paroi de l'oocyste (MEB x 160000) (Fayer *et al.*, 2010)

Actuellement, la détection des oocystes de *Cryptosporidium* dans les selles est l'examen de référence pour le diagnostic de la cryptosporidiose intestinale (Horne *et al.*, 2017). Les premiers cas de cryptosporidiose humaine furent publiés en 1976, à la fois chez des individus immunocompétents (Nime *et al.*, 1976) et immunodéprimés (Meisel *et al.*, 1976). Au début des années 1980, la pandémie de SIDA et la multiplication des situations d'immunodépression ont entraîné une augmentation significative du nombre de cas de cryptosporidiose humaine, témoignant ainsi du caractère opportuniste du parasite. Toutefois, l'infection est tout de même possible chez les sujets immunocompétents mais de façon sporadique ou associée à des épidémies. Cela se traduit par des diarrhées auto-résolutives, généralement sans complications. De nombreuses épidémies de cryptosporidiose ont été décrites à travers le monde au cours de ces dernières décennies. Chalmers *et al* ont rapportés 165 épidémies d'origine hydrique dues à *Cryptosporidium* (Chalmers, 2012) qui touchent à la fois des pays développés et des pays en voie de développement, aussi bien en zone rurale qu'en zone urbaine. Les travaux de Baldursson et Karanis ont également montré que 60% des maladies parasitaires d'origine hydrique en Europe et aux Etats-Unis entre 2004 et 2010 résultaient d'une infection à *Cryptosporidium* (Baldursson and Karanis, 2011). Cependant l'épidémie qui a fait à ce jour le plus de victimes fut celle de Milwaukee aux USA en

1993. En effet, plus de 400 000 personnes furent infectées et près de 60 personnes sont décédées (Mac Kenzie *et al.*, 1994) . Cette maladie est d'autant plus redoutable qu'il n'existe actuellement aucun traitement curatif efficace contre *Cryptosporidium* (Corso *et al.*, 2003; Manjunatha *et al.*, 2017).

1,2 Le cycle biologique du parasite

Cryptosporidium est un protozoaire qui infecte le tractus gastro-intestinal et plus rarement les poumons de nombreux vertébrés. La prolifération et la différenciation se déroulent à l'intérieur de la cellule, dans une vacuole parasitophore unique sous la bordure en brosse des cellules de l'hôte (Leitch and He, 2012). Les oocystes, forme de dissémination du parasite, sont très résistants dans le milieu extérieur dans lequel ils sont excrétés. Ils peuvent y survivre plusieurs mois, et résistent également aux désinfectants chlorés utilisés pour le traitement de l'eau. Ce parasite ne résiste toutefois pas aux traitements à l'ozone et aux UV qui diminuent le risque de contamination des réseaux d'eau potable (Widmer and Sullivan, 2012).

Cryptosporidium a un cycle de vie monoxène (se déroulant dans un seul hôte), et complexe comprenant une phase asexuée ou mérogonie et une phase sexuée ou gamétogonie (Figure IV-2). Après ingestion, la paroi de l'oocyste se rompt au moment du désenkystement qui semblerait être favorisé par l'action de la trypsine et des sels biliaires (Spano and Crisanti, 2000). Les quatre sporozoïtes sont alors libérés dans le tractus digestif. A l'aide de leur complexe apical, ces derniers pénètrent dans les cellules épithéliales, se logent dans des vacuoles parasitophores et se différencient en trophozoïtes. Le parasite acquiert alors une position qualifiée d'intracellulaire et extracytoplasmique et se maintient à hauteur de la bordure en brosse et donc extracytoplasmique. Le cycle de multiplication asexuée appelé également mérogonie ou schizogonie mène à la formation de mérontes de type I qui possèdent 8 mérozoïtes. Ces derniers sont libérés dans la lumière intestinale et envahissent les cellules voisines. Ils forment ensuite soit de nouveau des mérontes de type I, soit des mérontes de type II (contenant 4 mérozoïtes de type II). Le cycle de multiplication sexuée ou gamétogonie est initié par les mérozoïtes de type II qui se différencient en microgamontes (mâle) ou en macrogamontes (femelle). Chaque noyau contenu dans les microgamontes est ensuite incorporé dans un microgamète et les macrogamontes deviennent alors des macrogamètes. Une fois matures, les microgamètes fécondent le macrogamète pour donner naissance à un zygote diploïde, qui se différencie à son tour en oocystes *in situ*. De plus, deux types d'oocystes sont produits suite à cette fécondation : I) les oocystes à paroi fine intraluminaux libèrent directement des sporozoïtes qui pérennisent l'infection et permettent l'auto-infection tandis que II) les oocystes à paroi épaisse, plus

résistants, sont adaptés au milieu extérieur et permettent la dissémination du parasite dans la matière fécale) (Figure IV-2).

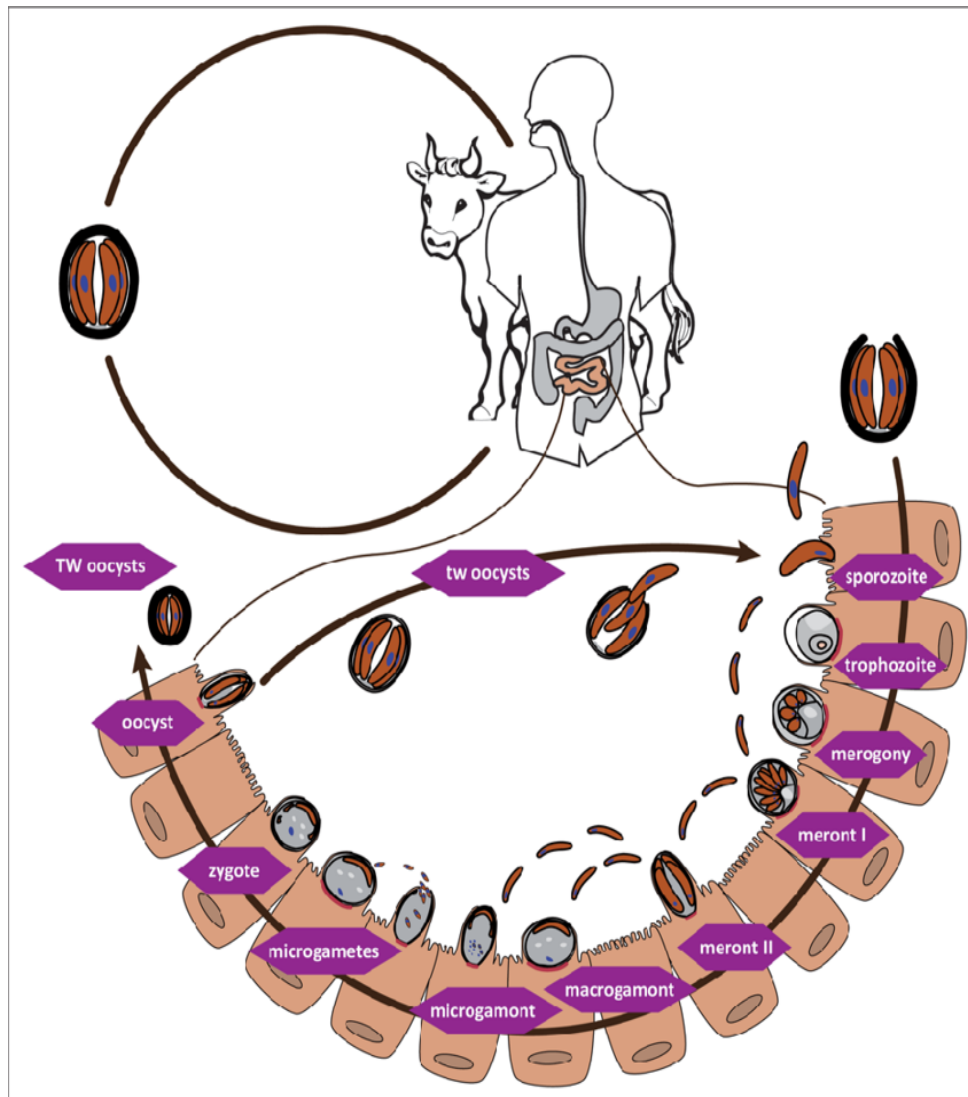


Figure IV-2 Cycle biologique de *Cryptosporidium* Après désenkystement des oocystes dans la lumière de l'intestin, les sporozoïtes pénètrent dans les cellules hôtes et se transforment en trophozoïtes dans des vacuoles parasitophores confinées au niveau de la région microvillositaire de l'épithélium muqueux. Les trophozoïtes subissent une division asexuée pour former des mérozoïtes qui, après avoir été libérés des meronts de type I pénètrent dans les cellules hôtes adjacentes pour former des meronts de type I ou de type II. Les meronts de type II entrent dans les cellules hôtes pour former les stades impliqués dans la reproduction sexuée, les microgamètes et les macrogamètes. La plupart des zygotes formés après la fécondation du macrogamète se développent en oocystes à paroi épaisse, et subissent une sporogonie pour former des oocystes sporulés contenant quatre sporozoïtes. Les oocystes sporulés libérés dans les fèces sont résistants dans l'environnement et entraînent une transmission de l'infection d'un hôte à un autre. Un pourcentage plus faible de zygotes (environ 20%), n'ont qu'une membrane entourant les quatre sporozoïtes. Ces oocystes à paroi mince sont impliqués dans un processus d'auto-infestation qui permet de maintenir l'infection de l'hôte sans nouvelle exposition par voie orale. D'après (Reduker *et al.*, 1985).

1,3 Position taxonomique de *Cryptosporidium*

Les parasites du genre *Cryptosporidium* sont des protistes intracellulaires appartenant au phylum des Apicomplexa (ou Sporozoaires) et sont compris actuellement dans le groupe des Alveolata (avec les Ciliés et les Dinophytes) (Lecointre and Guyader, 2001). Ce phylum regroupe de nombreux parasites rencontrés en pathologie humaine tels que *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Isospora*, *Sarcocystis*, *Cyclospora* et *Babesia*. La position systématique de *Cryptosporidium* au sein des organismes eucaryotes est exposée ci-après (Tableau IV-1).

Les caractéristiques utilisées pour identifier et nommer les espèces d'Apicomplexa ont traditionnellement été basées sur la morphologie, la spécificité d'hôte et l'emplacement des différents stades endogènes (Fayer, 2010). Cependant, ceci s'est avéré insuffisant pour distinguer des espèces de *Cryptosporidium*. En effet, des oocystes de différentes espèces de *Cryptosporidium* peuvent présenter des tailles et des morphologies similaires. D'autre part, des études ont montré que des isolats provenant d'une espèce animale donnée, pouvaient infecter une autre espèce. Ceci empêche alors l'identification des espèces de *Cryptosporidium* selon la spécificité de l'hôte.

Afin d'identifier les espèces au sein du genre *Cryptosporidium* présentant un risque pour l'Homme et pour les animaux, des outils moléculaires ont été développés. En ciblant des séquences définies du génome de *Cryptosporidium*, la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), le génotypage multiloci et le séquençage, ont permis de clarifier la taxonomie du genre (Slapeta, 2012). En 2004, Xiao et ses collaborateurs ont publié un ensemble de conditions permettant de définir et valider le concept d'espèce pour le genre *Cryptosporidium* et par là même, décrire de nouvelles espèces au sein de ce genre. Parmi ces critères, on retrouve ainsi les données morphométriques des oocystes, une caractérisation génétique par séquençage de marqueurs sur plusieurs loci, l'identification des hôtes naturels et expérimentaux et enfin le respect des règles de l'ICZN (International Code of Zoological Nomenclature). Les conditions pour nommer de nouvelles espèces, en accord avec les règles de l'ICZN, peuvent être résumées ainsi (Jirků *et al.*, 2008): (i) une description méticuleuse des oocystes et des autres stades du cycle de vie avec préservation de la collection d'échantillons provenant des tissus infectés, (ii) une caractérisation biologique et (iii) un diagnostic différentiel prenant en considération, si possible, une caractérisation génétique suivi de l'enregistrement des séquences et du matériel (Fayer, 2010). De plus, en raison d'une très importante variation allélique intra-spécifique de *Cryptosporidium*, de nombreux génotypes pouvant correspondre à des espèces encore cryptiques du parasite doivent être décrits.

Cependant, le degré de divergence est variable d'où la naissance du terme sous-génotype qui est parfois employé pour décrire des variations intra-génotypiques relativement mineures (Xiao *et al.*, 2004). Aujourd'hui 31 espèces ont été décrites et validées selon ces critères (Squire and Ryan, 2017).

Tableau IV-1 Taxonomie de *Cryptosporidium* : une coccidie atypique

<u>Hiérarchie</u>	<u>Dénomination</u>	<u>Principales caractéristiques</u>
Domaine	<i>Eukaryota</i>	ADN présent dans un noyau à double membrane
Règne	<i>Protozoa</i>	Organismes hétérotrophes unicellulaires (Aubert, 2016)
Phylum	<i>Apicomplexa</i>	Forme invasive munie d'un complexe apical
Classe	<i>Conoidasida</i>	Cycle de vie avec reproduction asexuée et sexuée.
Sous-classe	<i>Coccidiasina</i>	Microgamètes intracellulaires
Ordre	<i>Eucoccidiorida</i>	Présence de mérogonie
Sous-ordre	<i>Eimeriorina</i>	Développement indépendant des microgamontes et des macrogamontes
Famille	<i>Cryptosporidiidae</i>	Cycle biologique monoxène dans une vacuole parasitophore formée sur la membrane microvillositaire

1,4 *Cryptosporidium*, une grégarine ?

Depuis la description du genre *Cryptosporidium*, sa classification taxonomique a fait l'objet de multiples débats. Ainsi, ces dernières années, des équipes ont rapporté chez *Cryptosporidium* des caractéristiques qui semblent être partagées par les coccidies et les grégarines (Aubert, 2016; Carreno *et al.*, 1999). Certains auteurs placent le genre *Cryptosporidium* dans le groupe des Coccidies, mais séparé des coccidies typiques, à la base du phylum des Apicomplexa (Kuo *et al.*, 2008). Sur un plan phylogénétique, d'autres auteurs insistent sur un rapport probablement très étroit du genre avec la branche des grégarines (Chacín-Bonilla, 2007).

En effet, une étude menée par l'équipe d'Hijjawi en 2004 rapporte le déroulement du cycle vie de *Cryptosporidium* dans un milieu dépourvu de cellules hôtes (Hijjawi *et al.*, 2004). Ce n'est qu'en 2009 que la multiplication de l'ADN de *C. parvum* en absence de cellules hôtes a été confirmée (Zhang *et al.*, 2009). Durant cette même année, Hijjawi *et al.* (Hijjawi *et al.*, 2009) ont aussi décrit toutes les étapes du cycle de *C. hominis* dans un milieu dépourvu de cellules. Récemment, les formes de développement sexuel de *C. parvum* ont été étudiées (Aldeyarbi and Karanis, 2016) en utilisant la microscopie électronique à transmission. Selon ces auteurs, plusieurs ressemblances entre le cycle de développement du parasite et celui des grégarines sont observées. En fait, selon une étude récente (Ryan *et al.*, 2016a), *Cryptosporidium* pourrait être considéré comme une grégarine pour les raisons suivantes :

- Sa capacité à compléter son cycle de vie en l'absence de cellules hôtes
- La présence de formes extracellulaires semblables à celles d'un gamonte
- Le processus de syzygie où deux trophozoites mûres se rassemblent pour former un gamétocyte
- La capacité de *Cryptosporidium* à s'adapter à son environnement.

Bien que l'appartenance de *Cryptosporidium* à l'ordre des Gregarina ait déjà été suggérée par Tyzer en 1990, cette hypothèse reste encore sujette à controverse dans la communauté scientifique.

Parmi les 31 espèces de *Cryptosporidium* validées à ce jour, *C. parvum* et *C. hominis* sont responsables de 90% des cas de cryptosporidiose humaine. Toutefois, de nombreux travaux ont également mis l'accent sur l'aptitude d'autres espèces à infecter l'Homme telles que *C. meleagridis*, *C. cuniculus*, *C. andersoni*, *C. felis*, et *C. canis* mais dans une moindre mesure (Certad *et al.*, 2017) (Tableau IV-2.)

Tableau IV-2 Espèces de *Cryptosporidium* pouvant infecter l’Homme (inspiré de Certad *et al.*, 2017)

Espèces	Hôte principal	Mode de transmission	Références
<i>C. hominis</i>	Homme	Anthroponotique	(Ortega-Pierres <i>et al.</i> , 2009; Ryan <i>et al.</i> , 2016b)
<i>C. parvum</i>	Mammifères (Homme)	Zoonotique	(Ortega-Pierres <i>et al.</i> , 2009; Ryan <i>et al.</i> , 2016b)
<i>C. meleagridis</i>	Oiseaux, Mammifères (Homme)	Zoonotique	(Slapeta, 2012)
<i>C. cuniculus</i>	Lapin, Homme	Zoonotique	(Chalmers <i>et al.</i> , 2009)
<i>C. felis</i>	Chat	Zoonotique	(Lucio-Forster <i>et al.</i> , 2010)
<i>C. canis</i>	Chien	Zoonotique	(Lucio-Forster <i>et al.</i> , 2010)
<i>C. muris</i>	Rongeurs, Homme	Zoonotique	(Palmer <i>et al.</i> , 2003)
<i>C. ubiquitus</i>	Mammifères (Homme)	Zoonotique et anthroponotique	(Li <i>et al.</i> , 2014)
<i>C. viatorum</i>	Homme	Anthroponotique	(Adamu <i>et al.</i> , 2014; Elwin <i>et al.</i> , 2012)

2 La cryptosporidiose

Cryptosporidium est considéré aujourd’hui comme un problème majeur de santé publique. Ce statut d’agent pathogène est d’autant plus important que l’Organisation Mondiale de Santé (OMS) a décidé en 2004 d’ajouter la cryptosporidiose sur la liste des maladies négligées (WHO ; Neglected Diseases

Initiative). Il s'agit d'une maladie intestinale qui se manifeste le plus souvent par une diarrhée caractérisée par d'abondantes selles aqueuses (jusqu'à 10 fois/jour) qui peut s'accompagner d'une perte de poids rapide, de crampes abdominales, de nausées, de céphalées, de vomissements, de fièvre et de douleurs musculaires. Ces symptômes disparaissent généralement dans les deux semaines. La diarrhée peut cependant devenir chronique chez les patients sidéens ou immunodéprimés. Les enfants et les personnes âgées sont les plus touchés. Le pic de prévalence en fonction de l'âge diffère légèrement selon les études mais il se situe généralement chez les individus âgés de moins de 2 ans (ACNN, 2010; Leitch and He, 2012). Des études réalisées en Afrique, en Amérique centrale, en Amérique du sud et en Asie du sud-est montrent que la cryptosporidiose aiguë est un facteur prédictif de mortalité infantile (Kotloff, 2017; Widmer and Sullivan, 2012). Une étude multicentrique réalisée chez des enfants de moins de 5 ans en Afrique sub-saharienne et en Asie du sud nommé GEMS (the Global Enteric Multicenter Study), a montré que *Cryptosporidium* est l'un des cinq pathogènes responsables des diarrhées modérées à sévères (Kotloff *et al.*, 2013). Plus encore, la cryptosporidiose est même considérée comme la deuxième cause de mortalité par diarrhée chez ces enfants (Platts-Mills *et al.*, 2015; Striepen, 2013). Chez les patients sidéens, la diarrhée est chronique. Plus la charge parasitaire au niveau de l'intestin est importante, plus les symptômes sont fréquents et sévères (Leitch and He, 2012). Des atteintes extra-intestinales, gastriques, hépatobiliaires, pancréatiques et même respiratoires (Leitch and He, 2012) ont été observées chez les sujets immunodéprimés. Ces derniers peuvent être sensibles à l'infection par une large gamme d'espèces de *Cryptosporidium* spp. ou de génotypes qui n'infectent pas les individus immunocompétents (Morgan *et al.*, 2000; Plutzer and Karanis, 2009; Xiao *et al.*, 2000). Les manifestations cliniques de la cryptosporidiose ainsi que la virulence du parasite varient d'une espèce à l'autre mais également d'une souche à l'autre (Certad *et al.*, 2017). Chez l'Homme, *C. hominis* semble causer une cryptosporidiose plus aiguë avec une localisation extra-intestinale plus fréquente et des manifestations plus chroniques que pour les autres espèces (Leitch and He, 2012).

2,1 Facteurs de risque

Le risque de contracter une infection par *Cryptosporidium* varie fortement selon la sensibilité des individus. Cette différence dépend de l'âge et de l'état du système immunitaire de l'individu (Certad *et al.*, 2017). La dose minimale infectante (DMI) est en moyenne de 132 oocystes chez l'Homme immunocompétent (DuPont *et al.*, 1995) et elle serait inférieure à 10 oocystes chez l'Homme immunodéprimé (Ramratnam and Flanigan, 1997). Ces données dépendent des souches de *C. parvum* testées et de leur virulence. En effet, les DMI de trois souches distinctes de *C. parvum* sont

respectivement de 9, 87 et 1042 oocystes pour les souches TAMU, IOWA et UCP testées chez des volontaires sains (Okhuysen *et al.*, 1999).

2,2 Processus cellulaire épithélial initié après infection par *Cryptosporidium*

L'une des conséquences de la cryptosporidiose intestinale est l'atrophie villositaire (avec un raccourcissement ou une perte de microvillosités au niveau de la bordure en brosse (Huang and White, 2006). De plus, l'infection peut avoir des effets négatifs sur la croissance de l'épithélium intestinal. Le déséquilibre de l'absorption et de la sécrétion est probablement un facteur majeur de la manifestation de la maladie. L'infection par *Cryptosporidium* entraîne plusieurs dommages cellulaires, comme l'altération du cytosquelette. Celle-ci se manifeste par la rupture des jonctions cellulaires serrées, une perte de la barrière cellulaire et la modulation de l'apoptose (Adams *et al.*, 1994; Okhuysen and Chappell, 2002). A l'échelle moléculaire, l'invasion des entérocytes par *C. parvum* active le signal nucléaire-Kappa B (NF-Kb) initiant la production et la sécrétion de diverses cytokines et chimiokines, des peptides antimicrobiens (β -defensins et cathelicidins) et de l'oxyde nitrique qui peuvent tuer ou inhiber la croissance du parasite (Laurent *et al.*, 1998; O'Hara and Chen, 2011; Zhou *et al.*, 2012). Par la suite, ces chimiokines / cytokines d'origine entérocytaire, ainsi que des exosomes dérivés de cellules épithéliales, se mobilisent et activent des cellules effectrices immunitaires (Ex. Cellules NK, macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺) sur le site de l'infection (Chen *et al.*, 2001). Nous examinerons en détail les dommages causés par l'infection à *C. parvum* au niveau de l'intestin (Figure IV-3).

(i) Remodelage du cytosquelette

L'infection par *Cryptosporidium* induit notamment un remodelage du cytosquelette et une réorganisation locale de l'actine (Chen and LaRusso, 2000; O'Hara and Chen, 2011). Cette polymérisation de l'actine utilise les machineries de dérivation et de nucléation de l'actine du complexe protéiques Arp2 / 3 (Elliott *et al.*, 2001). Plusieurs voies de signalisation ont été identifiées pour moduler cette réorganisation et l'internalisation de *Cryptosporidium* telles que la PI3-kinase et le facteur d'échange de la guanine, l'activation de la petite GTPase, CDC42 par la voie Frabin dépendante et l'activation c-Src dépendante de la cortactine (Benamrouz *et al.*, 2014; O'Hara and Chen, 2011).

(ii) Modulation de l'apoptose

Il a été décrit précédemment que des protozoaires parasites intracellulaires pouvaient inhiber l'apoptose programmée de la cellule hôte. C'est notamment le cas de *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania sp.* ou *Theileria sp.* (Heussler *et al.*, 2001). Il a été démontré que *C.*

parvum active le facteur nucléaire κ B (NF κ B) empêchant l'apoptose des cellules épithéliales (Chen *et al.*, 2001). De plus, d'autres études montrent que *C. parvum* inhibe ce processus au stade de trophozoïte et le favorise aux stades sporozoïte et mérozoïte ainsi qu'à d'autres moments du cycle (Mele *et al.*, 2004). De plus, l'analyse de la transcription génique des cellules hôtes suggère une régulation biphasique de l'apoptose. En effet, elle révèle qu'au début de l'infection, les gènes ayant des rôles anti-apoptotiques sont sous exprimés alors que les gènes ayant des rôles apoptotiques sont sur-exprimés. A l'inverse, dans les stades plus avancés de l'infection, les gènes pro-apoptotiques sont induits alors que les gènes anti-apoptotiques sont sous-exprimés (Liu *et al.*, 2009).

(iii) Réponse immunitaire à l'infection à *Cryptosporidium*

Chez les individus immunocompétents, la cryptosporidiose est auto-résolutive alors que chez les patients immunodéprimés, l'infection peut devenir chronique voir potentiellement mortelle. Les systèmes immunitaires innés et adaptatifs semblent jouer un rôle majeur. L'immunité innée est la première barrière contre les pathogènes envahissants la cellule épithéliale intestinale (IEC) (Magalhaes *et al.*, 2007). Ces cellules expriment des récepteurs Toll-like (TLR) et des récepteurs intracellulaires de type Nod (NLR) qui permettent une reconnaissance microbienne aboutissant à l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-18 (facteur inducteur d'IFN- γ) (Okazawa *et al.*, 2004) et les chimiokines des classes C, CC et CXC (Petry *et al.*, 2010). Les IEC contribuent également au traitement et à la présentation de l'antigène *via* le complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) (Hershberg and Mayer, 2000). Différents modèles murins et porcins ont permis de montrer que d'autres facteurs semblent jouer un rôle important dans la réponse innée contre l'infection par *C. parvum* tel que l'IFN- γ . (Ungar *et al.*, 1991) et l'oxyde nitrique (NO) (produit par les macrophages et les neutrophiles) (Leitch and He, 1999; Petry *et al.*, 2010; Zadrozny *et al.*, 2006). Il est également à noter que les cellules dendritiques (impliquant IFN α / β) sont également impliquées dans la réponse de l'hôte à l'infection par *C. parvum* (Hayward *et al.*, 2001). D'autre part, des études expérimentales ont montré le rôle important des cellules T dans la réponse immunitaire contre l'infection à *Cryptosporidium* utilisant différents modèles murins comme les souris nude, SCID, ou BALB/c déficientes en lymphocytes T (Heine *et al.*, 1984, 1984; McDonald *et al.*, 1992; Mead *et al.*, 1991). Le rôle des lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ est connu depuis longtemps. Des études réalisées chez des veaux et des souris BALB/c infectées par des oocystes de *Cryptosporidium* soulignent que le rôle des lymphocytes T CD8⁺ n'est pas négligeable (Abrahamsen *et al.*, 1997; McDonald *et al.*, 1994) contrairement à ce que laissent penser certaines expériences réalisées sur des souris déficientes en MHC-I (importantes pour la fonction des cellules CD8⁺) (Chen *et al.*, 1993). Le rôle de la réponse Th2 est plus clair que celui de la réponse des lymphocytes T auxiliaires (Th) Th1 (McDonald, 2000).

Parallèlement, l'implication du complément a été mis en évidence par l'équipe de Petry (Jakobi and Petry, 2008). Enfin, le rôle des anticorps dans le contrôle de l'infection à *Cryptosporidium* est encore discutable. Toutefois, des études ont rapporté la présence d'IgG sériques spécifiques du parasite ainsi que des réponses IgA systémiques et muqueuses chez des souris infectées (Petry *et al.*, 2010).

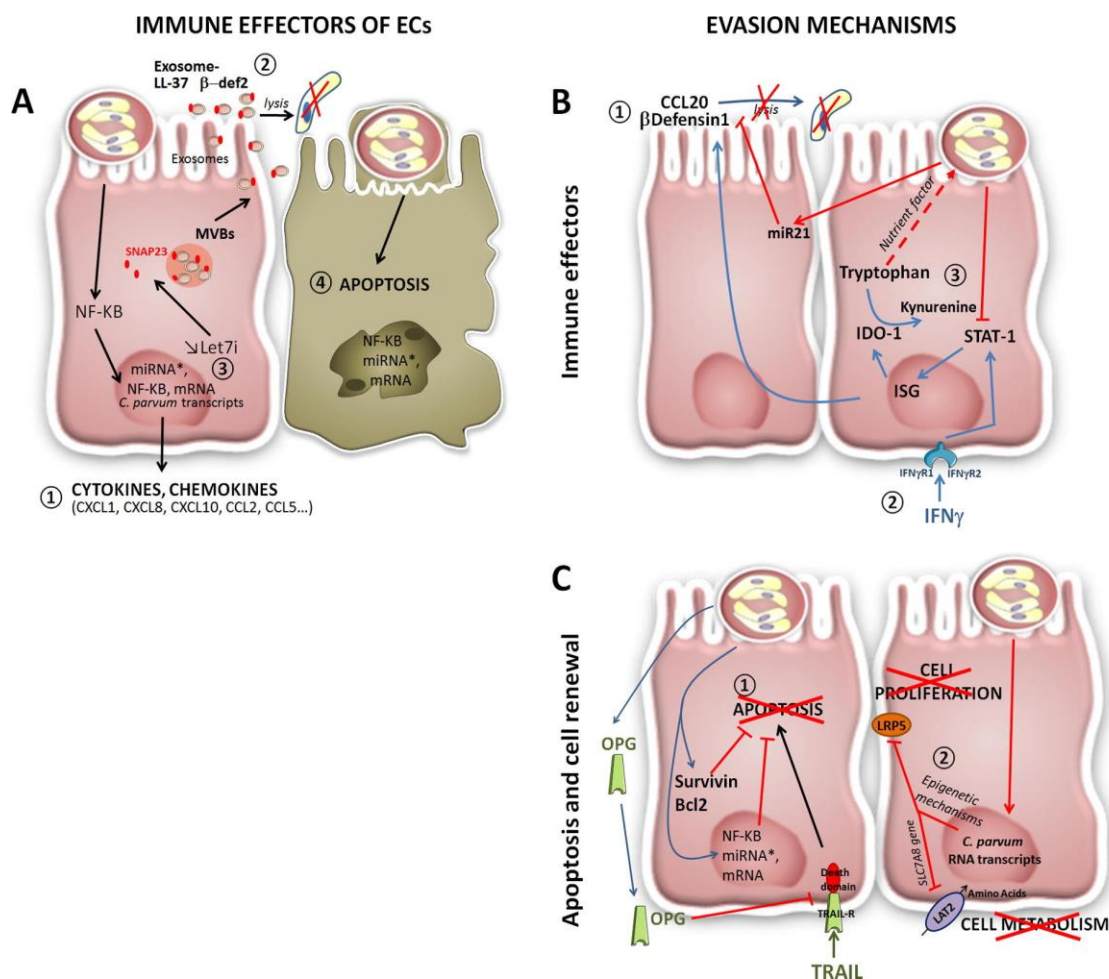


Figure IV-3 Mécanismes de défense des cellules épithéliales après infection par *C. parvum* (A) Les cellules épithéliales répondent à l'infection par *C. parvum* (i) elles produisent des cytokines et des chimiokines pour recruter des cellules immunitaires vers le site d'infection puis (ii) elles libèrent des peptides antimicrobiens (en formes libres ou associés aux exosomes) pour tuer les stades extracellulaires du parasite. L'apoptose est également déclenchée par les cellules hôtes pour inhiber la prolifération du parasite. (B) Les stratégies développées par *C. parvum* pour échapper à la réponse immunitaire des cellules hôtes. (1) *C. parvum* inhibe l'expression de CCL20 (Chemokine (C-C motif) ligand 20) par modulation de l'expression de miR21 (microRNA 21). (2) L'IFNγ active une cascade de molécules limitant ainsi la croissance parasitaire. (3) En revanche, *C. parvum* inhibe l'activité de IFNγ pour assurer son développement. (C) *Cryptosporidium parvum* induit la (1) production de survivine, de Bcl2, de NFκB et d'ostéoprotégérine pour prévenir l'apoptose et continuer son développement intercellulaire. (2) *C. parvum*, par des modifications épigénétiques, transcrit des gènes dans les noyaux des cellules infectées et empêche la transcription des gènes des cellules hôtes impliqués dans la prolifération cellulaire (LDL-R-Related protein 5 (LRP5)). (Laurent and Lacroix-Lamandé, 2017).

2,3 Modalités de transmission

La cryptosporidiose est une maladie liée à l'ingestion d'une quantité relativement faible d'oocystes émis dans les selles sous une forme directement infectante. L'inhalation d'oocystes mis en suspension sous forme d'aérosols a été décrite comme un autre mode de contamination chez l'enfant et le sujet immunodéprimé (Harari *et al.*, 1986; Mor *et al.*, 2010). Les symptômes associés à cette voie de transmission sont de type respiratoire (laryngotrachéite) et peuvent même s'accompagner d'une diarrhée modérée (Bouzid *et al.*, 2013). Cependant, cette voie de transmission ne permettait pas d'expliquer la survenue de cas de cryptosporidiose en milieu urbain, où le contact avec des animaux était plus restreint. L'explication donnée aux cas de contamination d'enfants au sein d'une même crèche ou d'une même collectivité, ou entre les membres d'une même famille, était l'existence d'une transmission inter-humaine (Ripert C. et Guyot K 2003). Bien que les animaux sauvages et domestiques puissent parfois être considérés comme de probables réservoirs de parasites, il semble que la transmission zoonotique directe soit négligeable comparée au risque lié à la contamination indirecte par l'eau de boisson par exemple. En effet, l'eau représente un des vecteurs principaux, qu'il s'agisse des eaux de surface (lacs, rivières...), des eaux d'irrigation, des eaux récréationnelles (piscine, bains à remous...) ou des eaux destinées à la consommation humaine. On estime aujourd'hui que 12 à 20 millions de personnes par an sont touchées par exemple aux Etats-Unis suite à des épidémies impliquant une transmission du parasite par voie hydrique (Bridge *et al.*, 2010) (Reynolds *et al.*, 2008). D'autres sources de contamination d'origine alimentaire ont également été répertoriées. Des produits crus ou non-pasteurisés tels que le lait, le jus de pomme, le persil et la ciboulette, ainsi que des salades ont déjà été mis en cause dans des épidémies de cryptosporidiose. Aux Etats-Unis, on cite des exemples de contamination (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1997; Millard *et al.*, 1994) même après ozonification (Blackburn *et al.*, 2006). D'autre part, de faibles concentrations de parasites ont été retrouvées dans l'eau embouteillée au Brésil (Franco and Cantusio Neto, 2002), à la surface des fruits au Mexique (Mota *et al.*, 2009), sur des feuilles de salade au Canada (Dixon *et al.*, 2013) et en Italie (Caradonna *et al.*, 2017).

2,1 Mesures de contrôle

L'application d'une bonne hygiène personnelle est une mesure efficace de contrôle de l'infection. Bien que la plupart des parasites protozoaires soient très résistants aux désinfectants chimiques couramment utilisés (Dixon *et al.*, 2013; Ortega and Sanchez, 2010), leur utilisation doit cependant être considérée comme un obstacle potentiel à la transmission de ces agents. De plus, certains gaz désinfectants se sont avérés très efficaces pour la désinfection (Ortega *et al.*, 2008). En termes de désinfection physique, une variété de technologies s'est révélée efficace contre les parasites sur les

produits frais ou les jus. C'est le cas de traitements tels que la pasteurisation (Deng and Cliver, 2001) ou le traitement à haute pression (Slifko *et al.*, 2000). Dans les régions endémiques, la santé des travailleurs agricoles devrait particulièrement être surveillée, et les employés malades ne devraient pas être autorisés à manipuler des aliments. En outre, le risque de contamination par des matières fécales grâce à l'accès direct des animaux aux terrains cultivés ou à une source d'eau est très élevé. Il est donc important que ces animaux n'aient pas accès, dans la mesure du possible, aux terres cultivées et aux produits frais.

2,2 Traitement

Les modalités de thérapie ou de prévention fiables contre la cryptosporidiose restent limitées (Sparks *et al* 2015). Chez les individus immunocompétents, la maladie est autorésolutive. Il est pourtant conseillé de donner une thérapie pour les enfants et les femmes enceintes (Chalmers and Katzer, 2013). En revanche, chez les personnes immunodéficientes, plusieurs molécules ont été testées telles que l'azithromycine, la paromomycine, la roxithromycine et la nitazoxanide. Cependant, ces traitements ne permettent pas l'éradication totale du parasite (Leitch and He, 2012). En outre, pour les patients atteints de SIDA, l'amélioration du statut immunitaire (Marcos and Gotuzzo, 2013) via l'administration d'associations d'antirétroviraux (HAART) reste encore le moyen le plus fiable pour contrôler l'infection (Guyot and Derouin, 2012).

Aux Etats-Unis, l'utilisation de la nitazoxanide n'est autorisée que chez les patients immunocompétents (adultes et enfants) (Rossignol, 2010). En effet, la nitazoxanide est un thialozide inhibant une enzyme de la chaîne mitochondriale (la pyruvate ferredoxine oxydoréductase) qui est essentielle pour assurer le métabolisme énergétique du parasite. Un autre mécanisme faisant intervenir le cycle benzène de la nitazoxanide a également été suggéré (Hemphill *et al.*, 2006).

3 *Cryptosporidium* et Cancer

Le cancer colorectal (CCR) est le troisième cancer le plus fréquent dans le monde et plus particulièrement dans les pays développés où 60% des nouveaux cas sont répertoriés (Farinetti *et al.*, 2017). Il est globalement le troisième cancer le plus fréquent chez l'homme et le troisième chez la femme (WHO, 2014) Il représente une cause importante de morbidité et de mortalité dans le monde. En France, ce cancer occupe la seconde place en termes de mortalité, derrière le cancer du poumon (santepubliquefrance.fr).

La carcinogenèse colorectale est décrite comme un processus qui résulte d'une progression multi-étapes et qui aboutit à un cancer invasif (Benamrouz *et al.*, 2012a). Ce processus séquentiel est

caractérisé par l'accumulation de multiples altérations génétiques et moléculaires dans les cellules épithéliales coliques (Munro *et al.*, 2017). Cependant, dans le développement du cancer colorectal, les facteurs externes ou environnementaux jouent probablement un rôle important. Les maladies intestinales inflammatoires, l'obésité, la consommation d'alcool et un régime alimentaire riche en matières grasses et à faible teneur en fibres ont tous été considérés comme des facteurs de risque favorisant le développement d'adénomes ou de carcinomes (Parsa, 2012).

Plus de 20 % des cas de cancers sont considérés aujourd'hui d'origine infectieuse qu'elle soit virale, bactérienne ou parasitaire (Cheeseman *et al.*, 2016). A ce jour, le potentiel oncogénique des virus a été caractérisé et il est en cours de caractérisation chez les bactéries (Certad *et al.*, 2007a, 2010c). En ce qui concerne les parasites, l'apparition de cancer de la vessie des décennies après une infection par *Schistosoma haematobium* est connue. D'autres parasites eucaryotes sont aussi suspectés d'être à l'origine de cancers tels que *Clonorchis sinensis* et *Opisthorchis viverrini* mais également des protozoaires parasites intracellulaires Apicomplexa comme *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, *Plasmodium*, ou *Theileria* (Benamrouz *et al.*, 2012a; Cheeseman *et al.*, 2016). Par exemple, sur les bases de données épidémiologiques, *Toxoplasma* a été associé à des tumeurs oculaires, à des leucémies et à des lymphomes (Shen *et al.*, 2001). *Theileria annulata* et *T. parva* sont des parasites qui infectent les bovins en immortalisant et transformant les cellules lymphocytaires de l'hôte, menant à une lymphoprolifération et une pathologie causant d'importantes pertes économiques dans les élevages. *Plasmodium falciparum* a depuis longtemps été associé aux lymphomes de Burkitt et parfois en association avec le virus d'Epstein-Barr (EBV). Depuis quelques années, *Cryptosporidium* est associé au cancer du tractus digestif chez l'homme et la souris. Cependant, le potentiel oncogénique des infections parasitaires reste négligé et la plupart des données se basent sur des études épidémiologiques et des évidences cliniques (Cheeseman and Weitzman, 2017).

3,1 Eléments cliniques montrant une association entre la pathologie cancéreuse et l'infection à *Cryptosporidium*

La première association entre *Cryptosporidium* et le cancer a été décrite en 1988 (Izquierdo *et al.*, 1988) quand un adénocarcinome du colon suspecté d'être lié à une cryptosporidiose, a été diagnostiqué chez une patiente souffrant de diarrhée chronique. Plus tard, il a été décrit, chez une patiente atteinte du VIH au Brésil, un cas de cryptosporidiose du tractus biliaire présentant des signes cliniques et des symptômes correspondant à une néoplasie de la tête du pancréas (Souza *et al.*, 2004). De plus, *C. parvum* semble être à l'origine de diarrhées continues associées à des cirrhoses et des cancers des voies biliaires chez des patients atteints du syndrome d'Hyper-IgM lié à l'X (XHIM) (Hayward *et al.*, 1997; Leven *et al.*, 2016; Tomizawa *et al.*, 2004). En 2007 et 2012, deux études

cliniques ont été réalisées en Pologne chez des patients atteints d'un cancer colorectal récemment diagnostiqué et n'ayant subi aucun traitement de chimiothérapie (Sulzyc-Bielicka *et al.*, 2007; Sulzyc-Bielicka *et al.*, 2012). L'étude menée en 2007 sur 55 patients a rapporté une prévalence de 18% de *Cryptosporidium* spp. Quant à la seconde étude réalisée cette fois sur 87 patients, une prévalence de 12,6% a été montrée. Les auteurs de ces deux études, précisent que cette dernière prévalence est similaire à celle trouvée chez les personnes VIH+ en Pologne comprise entre 6,7 et 12,8%. Cependant, ces études manquent d'un groupe témoin comme contrôle. Une autre étude compte 43% (6 /14) de cas de cryptosporidiose chez un groupe de patients polonais décrits comme immunocompétents (Bajer *et al.*, 2008). Néanmoins, la comparaison de cette valeur avec celle obtenue dans les études de Sulzyc-Bielicka *et al* ne semble pas judicieuse car il est difficile de considérer ce groupe comme un groupe témoin. En effet, dans l'étude de Bajer *et al.* (2008), les patients présentaient des douleurs abdominales associées ou non à des diarrhées. De plus, 13 des 14 patients analysés étaient des enfants, et l'on sait que les enfants sont plus susceptibles à la cryptosporidiose. Enfin, Sulzyc-Bielicka *et al* ont utilisé l'analyse immunoenzymatique ELISA pour la détection de *Cryptosporidium* qui reste une méthode moins sensible par rapport à la Nested PCR utilisée par Bajer *et al.* Une étude effectuée en Turquie sur 106 échantillons de patients atteints de diarrhée et de différents types de cancer a révélé que 17% d'entre eux étaient positifs pour les oocystes parasites (Tanyüksel *et al.*, 1995). D'autre part, dans le but d'évaluer, chez une population de personnes atteintes du SIDA, le risque de cancer colorectal et son association à des infections, une analyse épidémiologique rétrospective a été menée aux Etats-Unis (Shebl *et al.*, 2012). Des bases de données de 16 états ont été regroupées et croisées. Les résultats ont montré notamment que la présence de *Cryptosporidium*, tout comme l'infection par le VPH (Papillomavirus humain) augmentent significativement le risque de cancer colorectal.

Il est connu que les patients VIH+ sont fréquemment infectés par des parasites opportunistes tels que *Cryptosporidium*. De plus, le cancer colorectal a été identifié comme une des "non-AIDS defining malignancies" (non classant SIDA) avec une incidence 2,3 fois plus élevée chez les patients VIH+ par rapport à la population générale (Patel *et al.*, 2008). Ce cancer se développe à un âge plus précoce et d'une façon plus agressive chez les patients infectés par le VIH (Yegüez *et al.*, 2003). Ainsi même si la présence concomitante des parasites du genre *Cryptosporidium* avec de cancers colorectaux ne prouve pas nécessairement une notion de causalité, elle soulève toutefois chez l'Homme la question d'un éventuel lien qui mérite d'être appréhendé de manière plus systématique.

3,2 Preuves expérimentales de l'association entre *Cryptosporidium* et le cancer digestif

Il a été mis en évidence par Certad et ses collaborateurs (Certad *et al.*, 2007a, 2010a) que *C. parvum* est doté d'un pouvoir carcinogène lui permettant d'induire des adénocarcinomes invasifs pouvant atteindre les couches les plus externes du tractus gastro-intestinal (région iléo-caecale, estomac et voies biliaires), dans le modèle de souris SCID (Severe Combined Immunodeficiency) déficientes en lymphocytes T et B, et traitées ou non la dexaméthasone (Certad *et al.*, 2012). Il s'agit de la première observation d'un adénocarcinome induit par un protozoaire chez un mammifère (Benamrouz *et al.*, 2012b; Certad *et al.*, 2007a, 2010a) (Figure IV-4). De plus, des foyers de cellules épithéliales ont également été observés dans des vaisseaux sanguins de la sous muqueuse, signe d'une embolie vasculaire tumorale et d'une probable capacité des cellules transformées à se déplacer. La progression de la lésion peut être fulgurante, selon la souche de *C. parvum* inoculée. Un envahissement de la sous muqueuse au niveau iléo-caecal a été observé après seulement 60 jours d'infection. Il a également été montré qu'un seul parasite suffisait à induire non seulement une infection chronique chez les souris mais également l'apparition de lésions néoplasiques aussi bien dans la région antropylorique de l'estomac qu'au niveau de la région iléocæcale dès 45 jours post infection. Une variabilité importante de la pathogénicité en fonction des espèces de *Cryptosporidium* a été observée. De façon intéressante, l'espèce *C. muris* s'est avérée, dans le même modèle animal, incapable d'induire ce type de transformation épithéliale malgré sa colonisation chronique de la muqueuse gastrique (Certad *et al.*, 2007a). Cependant, deux autres espèces de *Cryptosporidium*, *C. hominis* et *C. molnari* ont été inoculées à des souris SCID traitées ou non à la dexaméthasone (SCID-D et SCID) mais aucune d'elles n'a pu se développer dans ce modèle (Certad *et al.*, 2010b, 2010c).

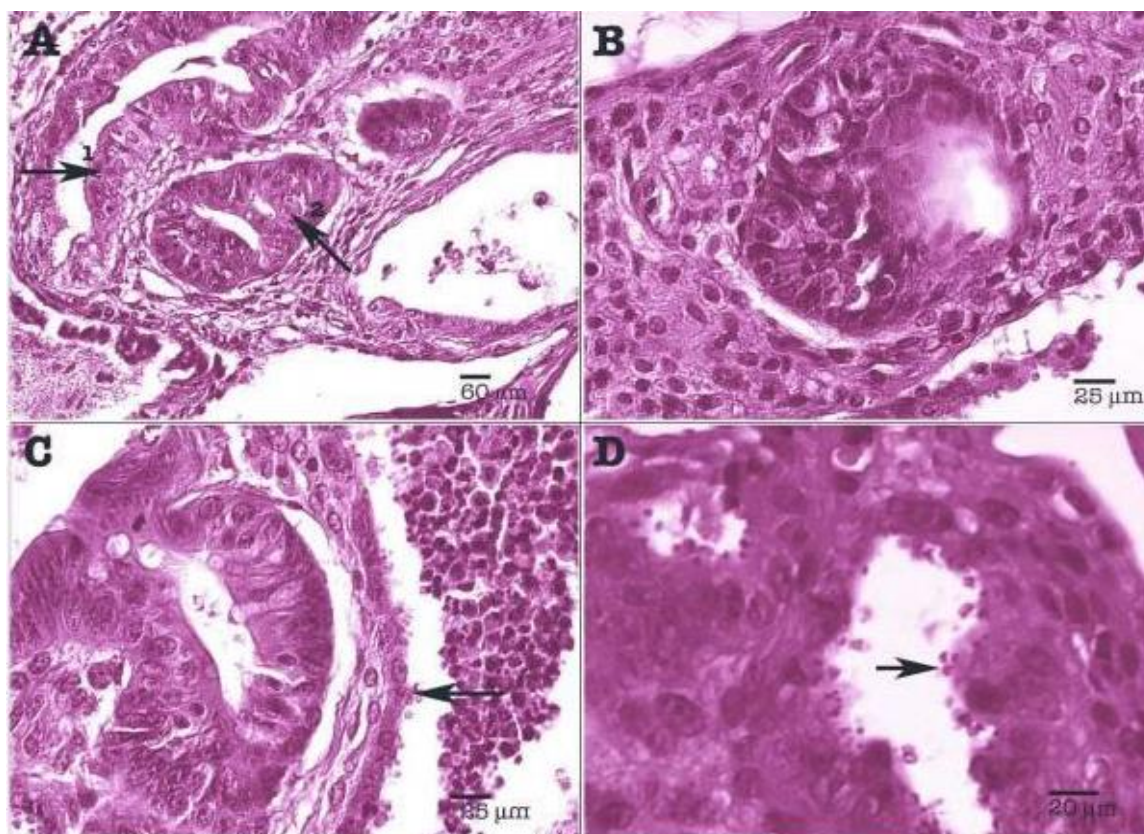


Figure IV-4 Modèle expérimental de souris SCID-D infectées par *C. parvum* lésions histologiques de la région caecale. (A) Polypes contenant des néoplasies intraépithéliales de haut-grade (flèche 1) et adénocarcinome intramuqueux (flèche 2) ; (B) Modifications nucléaires avec proéminence nucléaire et anomalies de condensation de la chromatine ; (C) et (D) Présence de nombreux parasites à divers stades de développement au sein de cellules épithéliales (flèches). [Coloration à l'hématoxyline & éosine]. (Certad *et al.*, 2007a)

Dans le but de caractériser les lésions néoplasiques induites par l'infection à *C. parvum* et d'explorer les différentes voies métaboliques impliquées dans la progression des néoplasies, les souris SCID-D ont été infectées par différentes souches de *C. parvum* (Benamrouz *et al.*, 2014). Cette nouvelle étude a démontré sur ce modèle, que les l'expression de l'*Apc* (adenomatous polyposis coli) et de la β -caténine, sont altérés, incriminant *de facto* la voie de signalisation *Wnt* (Wingless integration site)/ β -caténine dans les néoplasies induites par *C. parvum* (Figure IV-5). Des marquages immunohistochimiques réalisés sur des sections de la région iléo-caecale de souris infectées par *C. parvum* ont montré que l'intensité du marquage de l'*Apc* diminue graduellement dans le cytoplasme après l'infection et que la β -caténine s'accumule au niveau du cytoplasme. De plus, La p53 s'accumule également au niveau du cytoplasme et l'expression de la E-cadhérine est réduite (Figure IV-5) (Benamrouz *et al.*, 2014).

De plus, une dilatation des espaces intercellulaires accompagnées du développement d'extensions membranaires au niveau des jonctions adhérentes ont aussi été observées en microscopie électronique. Sur la base de ces observations, il semble que *C. parvum* induit un remodelage du cytosquelette de son hôte, qui conduit à une adhésion cellulaire réduite et à une conversion vers un phénotype migratoire.

Il a été décrit que l'infection par *Cryptosporidium* induit une la réorganisation de l'actine et des changements au niveau du cytosquelette de la cellule hôte (Giles *et al.* 2004). Ainsi, des axes de signalisation multiples liés à la réorganisation de l'actine et l'internalisation de *Cryptosporidium* ont été identifiés (PI3-Kinase, facteur d'échange de guanine, activation de la petite GTPase dépendante de Frabin et activation de cortactine dépendante de CDC42 et C-Src) (O'Hara, S,P and Chen, X.M. (2001). De plus, l'activation du facteur nucléaire KB (NF-KB) par *Cryptosporidium* afin de prévenir l'apoptose dans les cellules épithéliales biliaires a été décrite (Chen *et al.*, 2001). NFKB est impliqué dans l'activation de nombreux signaux de survie intracellulaires, y compris l'oncogène C-myc (Certad *et al.*, 2017). Cependant, il reste difficile de conclure sur l'origine spécifique de la transformation cellulaire induite par *Cryptosporidium*. La possibilité d'étudier le processus de cancérisation induit après infection parasitaire dépend de la disponibilité des modèles d'études *in vitro* qui nous permettraient de s'affranchir du modèle animal (*in vivo*) afin de déchiffrer la mécanistique des interactions hôtes parasites au niveau tissulaire.

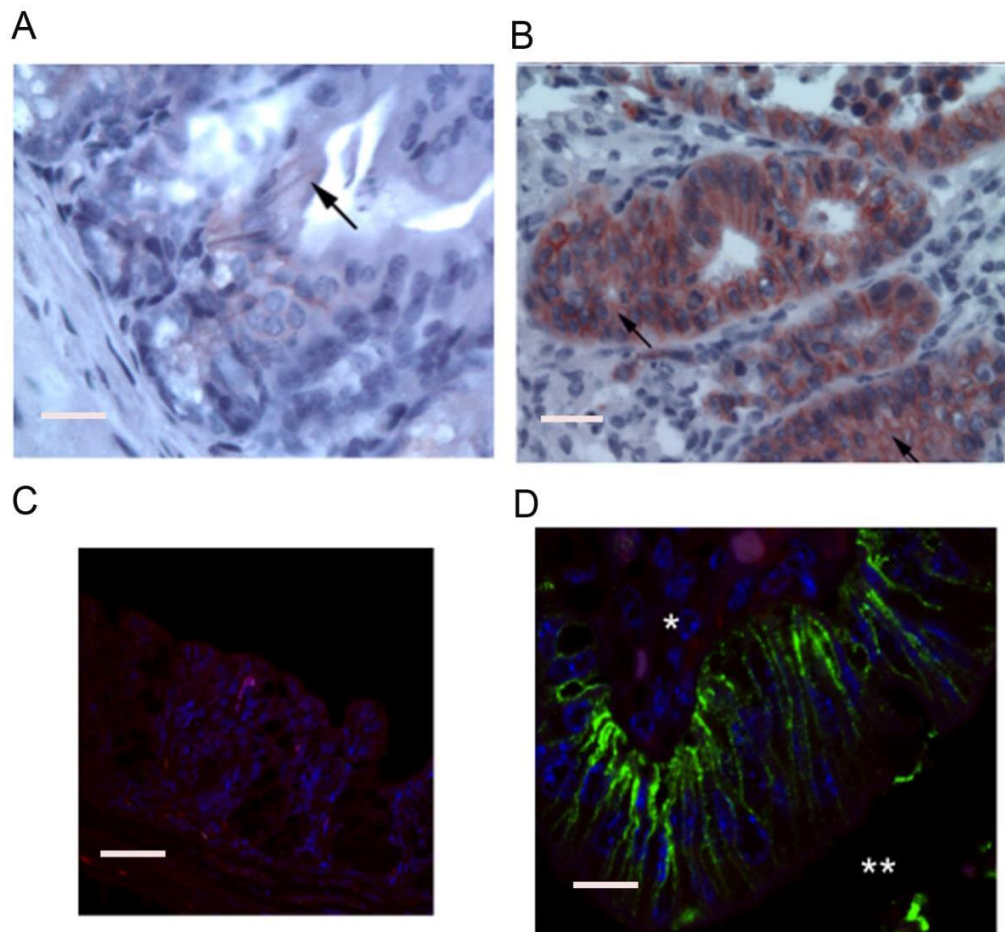


Figure IV-5 6 Détection de la localisation de la β -caténine A). Section d'une muqueuse normale de la région iléo-caecale montrant une expression légère membranaire (flèche) après marquage de la β -caténine. Bar = 10 μ m. (B) Section d'une région Ileo-caecales d'une souris SCID-Dexa infectée par *C. parvum* présentant un adénocarcinome invasif et euthanasiée à 107 jours P. I. montrent, après marquage de la β -caténine, une accumulation de cette dernière dans le cytoplasme et persistance du marquage membranaire flèche). Bar = 15 μ m. (C) Section d'une muqueuse normale montrant l'absence d'expression de la β -caténine après immunofluorescence en utilisant un anticorps anti- β -caténine dirigé contre l'extrémité C-terminale Bar = 5 μ m. (D) Section d'une région Ileo-caecales d'une souris infectée par *C. parvum* présentant un adénocarcinome invasif, euthanasiée après 90 jours P.I. La β -caténine présente une expression membranaire et juxtamembranaire au niveau basolatérale après immunofluorescence en utilisant un anticorps anti- β -caténine dirigé contre l'extrémité C-terminale. Bar = 25 μ m, * = membrane basale, ** = lumen des glandes. (Benamrouz *et al.*, 2014).

4 *Cryptosporidium*, modèles d'étude

4,1 Modèles animaux

Le modèle animal est l'un des outils auquel nous avons le plus recours pour l'étude de la cryptosporidiose. Cependant, les progrès réalisés dans les méthodes de culture et les problèmes éthiques qu'il soulève ainsi que la spécificité d'hôte relative de certaines espèces tendent à en réduire l'utilisation.

Le modèle murin est le modèle le plus communément utilisé car il offre l'avantage d'être pratique d'utilisation et à moindre coût. Il est tout de même à noter cependant, que les souris immunocompétentes résistent ou tendent à éliminer le parasite au bout de quelques jours seulement (Garza *et al.*, 2008) ont rapporté que des souris C57BL/6 immunocompétentes infectées avec des oocystes prétraités à l'eau acidifiée atteignaient un pic d'excrétion vers 12 jours puis finissaient par se débarrasser du parasite. Ce modèle murin a également été utilisé par Costa *et al* qui ont pu ainsi observer les manifestations cliniques de la cryptosporidiose. Sayed *et al* ont quant à eux, fait le choix d'utiliser des souris Swiss albinos qui leur ont permis de maintenir une infection durant au moins 14 jours et de montrer des différences de virulence entre la souche IOWA de *C. parvum* et une souche hydrique provenant du réseau d'approvisionnement local en eau de Assiut en Egypte (Sayed *et al.*, 2016). Les souris CD1 et BALB/c quant à elles résistent à l'infection sauf lorsqu'elles sont germ free ou qu'elles ont reçu un traitement antibiotique (Harp *et al.*, 1988). Par contre, les souris néonatales de ces espèces murines sont moins résistantes à l'infection, ce qui doit être dû à l'absence d'une flore intestinale mature (Harp *et al.*, 1988). En effet Sherwood *et al* ont testé 8 espèces de souris de laboratoire. Parmi lesquelles, se trouvaient notamment des BALB/c et des C57Black. Toutes ont montré une sensibilité à l'infection à *C. parvum* lorsqu'elles étaient inoculées à l'âge de 1 à 4 jours. Cette sensibilité devient transitoire à l'âge de 21 jours (Sherwood *et al.*, 1982). Des observations similaires ont été rapportées par (Mehran Mirza-Qavami and Sadraei, 2011) qui ont infectés quarante souris BALB/c néonatales avec *C. parvum* et toutes atteignent un pic d'excrétion à 9 jours pour redescendre au point le plus bas à 16 jours. Ce même modèle a également été utilisé pour étudier la réponse immunitaire induite par l'infection à *C. parvum*. D'autres études (Ahmadian *et al.*, 2016; Boher *et al.*, 1994; Kvác *et al.*, 2007) ont montré que les souris « multimamate » (*Mastomys coucha*) nouvellement nées étaient sensibles à l'espèce *C. andersoni*. Cependant, l'utilisation de ce modèle est limitée car en plus du fait d'offrir une infection transitoire, la manipulation des souriceaux est difficile étant donné leur petite taille qui est comparable à celle d'un pouce humain (Certad *et al.*, 2008). Les modèles adultes sont donc privilégiés. C'est pourquoi, plusieurs équipes ont choisi pour leurs travaux une autre alternative, à savoir des souris immunodéprimées et ce malgré le fait qu'elles soient moins sensibles à l'infection que les souriceaux nouveaux nés (Yousof *et al.*, 2017). L'immunodépression peut être soit chimique soit génétique. L'immunosuppression chimique peut être obtenue soit par l'action d'anticorps (anti-CD4, anti-CD8, anti-IL2, anti-IFG, et anti-IFN gamma) (McDonald *et al.*, 1992) ou par l'utilisation de corticoïdes. L'efficacité de l'administration des corticoïdes dépend (i) du fond génétique des souris utilisées, par exemple, le fond C57BL/6 traité à la dexaméthasone a été décrit comme l'un des plus sensibles, (ii) du mode d'administration, cela est quelque peu sujet à controverse entre la voie orale et intrapéritonéale et enfin (iii) du type de

drogue utilisée. La dexaméthasone est la plus communément utilisée mais d'autres drogues ont également permis d'obtenir une immunosuppression, telle que l'acétate de méthylprednisolone injecté par voie sous-cutanée. D'autre part, l'immunosuppression chimique offre l'avantage d'un mode d'administration pratique le plus souvent dans l'eau de boisson. Cependant, l'immunosuppression nécessite de maintenir le traitement durant toute la durée de l'expérimentation. C'est pourquoi il est parfois nécessaire d'avoir recours à des souris immunodéprimées génétiquement en y associant ou non un traitement.

Différentes lignées de souris ont été testées pour l'étude de la cryptosporidiose. Parmi lesquelles on compte, les souris Nude (Heine *et al.*, 1984; Taylor *et al.*, 1999), les souris déficientes en CMH de type II (Aguirre *et al.*, 1994), les souris knockout en interleukine-12 (Gorla *et al.*, 2014) et enfin les souris SCID qui ont permis une découverte majeure à savoir que *C. parvum* était doté d'un pouvoir carcinogène. En effet, Certad *et al* ont montré que *C. parvum* pouvait donc induire le développement d'adénocarcinomes digestifs invasifs chez des souris SCID traitées ou non à la dexaméthasone et ce même avec de très faibles inocula (Benamrouz *et al.*, 2012b, 2014, Certad *et al.*, 2007b, 2010b).

D'autres espèces animales ont également été utilisées. Nous pouvons citer le modèle rat immunodéprimé (génétiquement ou chimiquement). Des rats Sprague-Dawley traités à l'acétate d'hydrocortisone ont ainsi pu maintenir une infection chronique pendant plus de 38 jours (Brasseur *et al.*, 1988). Le modèle hamster qui s'est avéré sensible à *C. parvum* et *C. muris* (Rasmussen and Healey, 1992; Rhee *et al.*, 1999; Rossi *et al.*, 1990). Le modèle gerbilles de Mongolie (*Meriones unguiculatus*) a souvent été utilisé pour étudier l'infection à *C. parvum* mais également à *C. muris*, *C. andersoni* et à *C. hominis* (Baishanbo *et al.*, 2005, 2006; Kvac *et al.*, 2007). En outre, le modèle porcelet continue à être utilisé (Widmer *et al.*, 2000) notamment pour étudier l'efficacité de certains traitements. Lee *et al* ont ainsi pu confirmer l'efficacité partielle ou incomplète du traitement à la nitazoxanide dans le traitement de la cryptosporidiose chez l'enfant en utilisant comme modèle d'étude des porcelets gnotobiotiques (Lee *et al.*, 2017) D'autres modèles tel que le veau nouveau-né et le cobaye ont également montré leurs utilité (Chrisp *et al.*, 1990; Manjunatha *et al.*, 2016; Widmer and Sullivan, 2012).

Aujourd'hui encore le modèle animal reste incontournable dans l'étude de la cryptosporidiose et plus particulièrement dans la validation de cibles thérapeutiques. Une étude très intéressante récemment menée par Manjunatha *et al* a montré que des inhibiteurs de la PI(4)K de *C. parvum* et de *C. hominis* tel que le pyrazolopyridine KDU731 pouvaient être considérés comme un traitement prometteur contre la cryptosporidiose. Pour évaluer aussi bien la toxicité que l'efficacité de leur traitement ils

ont dû avoir recours à différents modèles animaux à savoir, des macaques rhésus, des rats Wistar, des souris CD-1 et C57BL/6 IFN- γ -knockout et enfin des veaux nouveau-nés (Manjunatha *et al.*, 2016). Cependant, comme indiqué en préambule les réglementations qui régissent l'utilisation des animaux nous obligent à en réduire l'utilisation, d'où la nécessité de développer des méthodes *in vitro* qui pourraient reproduire au plus près ce qui se passe *in vivo*.

4,2 Méthodes de Culture de *Cryptosporidium*

Malgré les investissements réalisés dans les infrastructures d'assainissement de l'eau et la législation régulant la qualité de celle-ci dans les pays développés, il est évident que la cryptosporidiose demeure un problème de santé publique. Avec la reconnaissance de l'importance de ce microorganisme au cours des dernières décennies, la communauté scientifique a été encouragée à poursuivre ses travaux de recherche sur *Cryptosporidium*. L'un des facteurs majeurs limitant la connaissance de la biologie du parasite et le développement de traitements et/ou de vaccins contre la cryptosporidiose est l'absence d'un système de culture pratique et reproductible. D'autre part, certains outils utilisés pour l'étude des Apicomplexa ne peuvent pas l'être pour *Cryptosporidium*. Les méthodes permettant un développement continu du parasite (comme celles habituellement utilisées avec *Toxoplasma* spp), une production efficace d'oocystes matures et infectieux et une cryoconservation pour avoir à disposition des stocks clonés sont toujours manquantes.

Dans la revue qui suit, les nouvelles avancées concernant les méthodes de culture de *Cryptosporidium* ont été examinées. Chaque modèle de culture *in vitro* a été détaillé tout comme son apport dans la compréhension de la pathogenèse des *Cryptosporidium* spp. La comparaison entre la culture cellulaire, la culture axénique et la culture tridimensionnelle 3D met en évidence les limites de chaque méthode de culture. Cette revue fournira également des informations sur les nouvelles techniques de culture de *Cryptosporidium*, y compris de nouveaux systèmes biologiques tels que l'explant intestinal et la culture 3D qui ouvriront de nouveaux horizons dans la compréhension de la pathogenèse, le traitement et le contrôle de ce parasite.

Cette revue a été soumise au journal *Parasite and Vectors* (Article 1)

Update on Cryptosporidium Culture: Current use and future perspectives

Martha Baydoun^{1,2,3}

Email: martha.e.b@hotmail.com

Sadia Benamrouz Vanneste^{1,4}

Email: sadia.benamrouz@univ-catholille.fr

Karine Guyot¹

Email : karine.guyot@pasteur-lille.fr

Vincent Senez³

Email: vincent.senez@isen.fr

Jérôme Follet^{2,3}

Email: jerome.follet@yncrea.fr

Eric Viscogliosi¹

Email: eric.viscogliosi@pasteur-lille.fr

Gabriela Certad^{1,5}

*Corresponding author

Email: gabriela.certad@pasteur-lille.fr

¹: Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR 8204 – CIIL – Centre d’Infection et d’Immunité de Lille, Lille, France

²: ISA-YNCREA Hauts de France, Lille, France.

³ Univ. Lille, CNRS, ISEN, UMR 8520 - IEMN, Institut d’Electronique, de Microelectronique et de Nanotechnologie, Lille, France.

⁴: Ecologie et biodiversité, Faculté Libre des Sciences et Technologies de Lille, Univ. Catholique de Lille, France

⁵: Département de la Recherche Médicale, Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille (GHICL), Faculté de Médecine et Maïeutique, Université Catholique de Lille, Lille, France.

Running title: Update on *Cryptosporidium* culture

Ethics approval and consent to participate: N/A

Consent for publication: N/A

Availability of data and material: N/A

Competing interests: None

Funding: This work was funded by grants from the “Conseil Régional des Hauts de France”, the “Métropole Européenne de Lille”, the Catholic University of Lille, the Institut Pasteur de Lille, the Centre Nationale de la Recherche Scientifique and the University of Lille

Authors' contributions: MB wrote the manuscript, SBV corrected the manuscript, KG, JF, VS and EV participated in the correction of the manuscript, GC made essential contribution in writing and correcting the manuscript and given final approval of the version to be published.

Acknowledgements: Mr Nigel Clifford for his valuable participation

Correspondence address: gabriela.certad@pasteur-lille.fr

Université de Lille. CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR 8204 – CIIL – Centre d’Infection et d’Immunité de Lille , 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille cedex, France

Faculté de Médecine et de Maïeutique, Université. Catholique de Lille, Université. de Lille, France.

Abstract

Cryptosporidiosis represents a major public health problem caused by the apicomplexan protozoan *Cryptosporidium*. This parasite constitutes a significant risk to humans and animals and causes self-limited diarrhea in immunocompetent hosts and life-threatening disease in immunocompromised hosts. The study of the life cycle and pathophysiology of this parasite is of crucial interest. For this reason, the development of a reproducible culture model is required, since

in-vitro culture systems represent powerful tools. This overview is an update of the new findings regarding *Cryptosporidium* culture methods. We discuss each *in-vitro* model and how these approaches contribute to the understanding of the pathogenesis of *Cryptosporidium*. A comparison between the cell culture, cell-free culture and tissue culture elucidates the limitations of each culture method. This review provides information about new techniques for the culture of *Cryptosporidium*, including novel biological systems such as intestinal explants and three-dimensional (3D) cultures, which will open up new avenues in the near future for the investigation of the pathogenesis, host-parasite interaction, treatment and control of this parasite.

Introduction

Cryptosporidiosis represents a major public health problem caused by the apicomplexan protozoa, *Cryptosporidium*. This parasite is a ubiquitous intracellular agent constituting a significant risk to humans and animals, causing self-limited diarrhea in immunocompetent hosts and life-threatening disease in immunocompromised hosts. Five major *Cryptosporidium* species are responsible for infections in humans: *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium canis* and *Cryptosporidium felis*, whereby *C. hominis* and *C. parvum* are the most common species infecting humans[1]. In fact, *Cryptosporidium* has been categorized by the National Institutes of Health (NIH) as a category B biodefense agent [2]. Furthermore, results from the Global Enteric Multicenter Study (GEMS) showed that *Cryptosporidium* spp. are among the leading causes of moderate to severe diarrhea in children under 2 years as reported in a cohort study involving 22,500 children in Africa and Asia [3]. Additionally, cryptosporidiosis remains a clinically significant opportunistic infection in patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection or immunosuppression due to cancer treatment [4] . Moreover, Bhadauria *et al.* conducted a retrospective study of transplant recipients admitted for evaluation of diarrhea, and *Cryptosporidium* was found to be the most common cause of infectious diarrhea in these patients [5].

The usual clinical manifestations of *Cryptosporidium* infection (cryptosporidiosis) are diarrhea, nausea, vomiting, fever and abdominal pain [6]. Cryptosporidiosis can also lead to chronic and extraintestinal manifestations in immunosuppressed individuals[7, 8]. A wide spectrum of clinical signs associated with *Cryptosporidium* infection, ranging from asymptomatic to severe disease, and even death, has been described[9]. However, the mechanisms that contribute to disease caused by *Cryptosporidium* are not yet fully understood. Cryptosporidiosis occurs after ingestion of infectious oocysts. In fact, *Cryptosporidium* oocysts can survive in the environment for long periods

and still remain infective at low doses, which raises public health interest. *Cryptosporidium* is transmitted mainly via the fecal-oral route and via contaminated water[10]. Indeed, *Cryptosporidium* has been considered as the infectious agent responsible for more than 60% of waterborne outbreaks worldwide[11, 12]. For instance, in the United States, *Cryptosporidium* is the leading cause of waterborne outbreaks [13]. The best known example of a waterborne outbreak caused by this parasite was reported in Milwaukee (USA), where over 400,000 people became ill and 100 people died due to increased contamination of source water and a breakdown in the water filtration process at a water treatment plant in the city [14].

On the other hand, up to now, *Cryptosporidium* is one of the most resistant protozoan parasites. Few drugs have been found to be effective against *Cryptosporidium* in *in-vitro* culture, in animal models, or in patients, and these are not curative, having only partial effects; and none has proven to be effective in severely immunocompromised patients, where the improvement of cellular immune function is the key priority for the management of cryptosporidiosis. The current treatment options are limited to nitazoxanide, which accelerates the resolution of symptoms in immunocompetent patients, but shows low benefits in immunocompromised patients. Furthermore, the target of nitazoxanide is not known, so no clinically validated targets exist for the treatment of cryptosporidiosis [15]. In addition, none of the common treatments against protozoan parasites are effective against *Cryptosporidium* and the application of experimental results from other coccidian parasites is not possible, due to the peculiarities of this parasite. Indeed, this parasite remains the only major diarrheal cause for which no effective therapy is available[16].

Cryptosporidium has a multistage life cycle. Once ingested, oocysts release sporozoites into the intestine. The sporozoites, infectious forms of the parasite, invade the cells and undergo intracellular development to a trophozoite stage, which undergoes asexual proliferation to produce two different types of meront. Merozoites released from meront type I invade other epithelial cells and either develop into type II meronts or complete another cycle of type I meronts. The merozoites undergo sexual multiplication to produce microgamonts and macrogamonts. The fertilization between the microgamonts and macrogamonts results in the production of zygotes which mature into oocysts[17]. All these arguments show that the study of the life cycle and pathophysiology of this parasite are of crucial interest. This is why different *Cryptosporidium* culture models have been developed in order to help in understanding the *Cryptosporidium* life cycle and pathogenesis, and for the development of specific anticryptosporidial drugs and/or vaccines.

Although considerable efforts have been made to develop *Cryptosporidium in vitro* cultivation models, several obstacles remain in the maintenance of *Cryptosporidium* in *in-vitro* culture. Until

recently, continuous culture of the parasite was not possible, and an efficient production of mature, infectious oocysts is still needed[18].

To our knowledge in the last decades the review detailing the different systems of cell culture applied to *Cryptosporidium* was published by Karanis and Aldeyarbi (2011). These authors outlined the development biology of *Cryptosporidium* and its physiological aspects as well as the impact of the variation in the oocyst dosage, age, storage, conditions, processing methods on the outcome in infection strategies. Recently, a new review was published by Karanis[19] detailing several *in vitro* cell cultures techniques while focusing on the cell-free culture. More precisely, the author devoted a big part of the review to the free-cell culture, its history and recent development. Therefore, our overview is complementary but written with a different point of view. Herein we discuss each *in vitro* model and the new insights contributing to the understanding of the pathogenesis of *Cryptosporidium* spp. A comparison between the cell culture, cell-free culture and tissue culture elucidates the limitations of each culture method. This review provides information about new techniques for the culture of *Cryptosporidium*, including novel biological systems such as intestinal explants and three-dimensional (3D) culture.

Pros and cons of *Cryptosporidium* culture conditions according to cell types

Cryptosporidium culture conditions can be divided into two major groups as follows: cell culture and axenic culture. When considering cell assays, the susceptibility of different cell types to parasite invasion also needs to be taken into account. There are two main possibilities: primary cells, isolated from animal organs or tissues, or immortalized cell lines. Besides the type of cells, the feasibility of the culture should take into consideration: the continuous production of newly formed oocysts, suggesting the completion of the parasite cycle and the ability to study the host-parasite interaction. Some of the pros and cons of these different systems will be described below

***Cryptosporidium* cell culture assays**

The complete *C. parvum* cycle, including asexual and sexual development, has been observed using adherent epithelial cell lines including Caco-2, MDCK and HCT8 (human colonic adenocarcinoma cells), HT29, BFTE (bovine fallopian tube epithelial cells) and BS-C-1 (African green monkey cells). Some of these types of cell lines are cancer-derived or immortalized cell lines, such as, Caco-2, HT29 or HCT8. Nevertheless, HCT-8 cells continue to be those most selected for this type of culture[18]. This cell line supports a higher rate of infection than the alternatives without diminishing with age[20] in a conventional 5% CO₂ environment[21]. The use of HCT8 was useful in investigating the transcriptome of *C. parvum* over 72 hours of *in-vitro* infection[22]. However, the utilization of immortalized cells lines limits the study of the host-pathogen interaction and the

understanding of the microenvironment that contributes significantly to the cell response.

In order to preclude the problem of the utilization of transformed cells, other models have been tested. For instance, a model of non-carcinoma, human small intestinal epithelial cells, FHs 74 Int, mimicking *in-vivo* conditions, was evaluated by Varughese *et al.*, 2014. The comparison between this non-carcinoma cell line and other carcinoma cells showed higher levels of infection susceptibility. However, the culture could be maintained only for a short period of 48 hours[23, 24]. Although this model is not adequate for continuous culture, it may be useful for studying the step of *Cryptosporidium* invasion of host cells.

Concerning the limited survival of parasites in culture it is well known that experimental *Cryptosporidium* infections reach a peak at 2–3 days PI [25] and decline with the onset of the sexual cycle[26]. Despite the use of large inocula of the parasite to infect cells, the number of oocysts produced is always low[18]. Cell detachment and apoptosis in *Cryptosporidium*-infected cell cultures contributes to reduce parasite survival *in vitro* [27]. In addition, the rapid maturation, overgrowth and death of host cells, results in the termination of the *Cryptosporidium* life cycle [28]. Moreover, due to host cell overgrowth, for most *Cryptosporidium* cell culture assays, monolayers are allowed to develop for 24 or 48h to reach 80 to 100% confluence before inoculation. The cells are then processed for detection of infection 48 to 72 h post-inoculation. This can be problematic when coordinating and processing cell monolayers for inoculation [20].

The factors that affect the development and proliferation of *Cryptosporidium* in *in-vitro* cultures include the excystation protocol, age and strain of the parasite, the stage and size of inoculum, the host cell type, the maturity and culture conditions such as pH, medium supplements and atmosphere [21]. In a recent article, the important role of lactate dehydrogenase in *C. parvum* growth and development was shown [29]. While many efforts have been made to improve cell culture by taking some of these factors in consideration, this system still remains limited in time (<6 days). However, subculturing [26], irradiation, maintaining an optimal pH [30] and changes to the culture medium [27] seem to be major factors that lead to better long-term maintenance and propagation of at least the three species *C. parvum*, *C. hominis* and *C. andersoni*[11]. In these case scenarios, the culture is sustained for more than 6 days, although the changes described above induce more stress to the cells.

The use of quantitative PCR (qPCR) to measure the increase in parasite DNA is an alternative methodology for quantification. This method has been used to assess overall growth in cell culture[31] and evaluate the role of TLRs (toll-like receptors) in host cells upon parasite infection [32]. In fact, Yang *et al.* showed that, after infection, bovine intestinal epithelial cells can employ all 10 TLRs. TRL2 and TRL4 seems to be more particularly engaged in the recognition of the infection

and the induction of NF- κ B upon infection [32]. Recently, the qPCR method was used to clarify events in the early life cycle of the parasite from sporozoite hatching to merogony in both cell-free and HCT-8 cultures [33]. According to their results, the authors hypothesized that, 12h after inoculation, *Cryptosporidium* sporozoites bind to host cells. This observation would dismiss the idea that 3h is sufficient for the parasite to attach to host cells [34]. In a recent study, the authors were able to establish a correlation between electrical response and parasitic stage development in culture, and to quantify sample infectivity[35]. In order to get insights into *Cryptosporidium* development in cells, an electrical impedance-based device was adapted to an HTC8 culture system infected with the parasite. A reproducible distinct succession of peaks at 12 h PI, 23 h PI and 31 h PI, corresponding to different stages of the parasites, was found. This method could be used to monitor the real-time response of a cell culture infected by *Cryptosporidium*. Furthermore, the cell culture has been used to investigate the role of small molecules in controlling cryptosporidiosis [36–38]. Although short-term cell culture have been used to screen small molecule inhibitors of *C. parvum* replication, the inability to propagate the parasite *in vitro* is identified as a major hurdle for drug development[39]. Despite considerable efforts to achieve an *in-vitro* culture of *Cryptosporidium* in cell systems, several obstacles still remain. Culturing *Cryptosporidium* in conventional cell monolayers has proven to be unsuitable for long-term propagation, since the level of infection decreases over time and few oocysts are produced. Another disadvantage of the cell culture is the intensive labor required for the growth and maintenance of the cell monolayer and prolonged incubation periods[40].

Table 1. Summary of some *Cryptosporidium* cell culture methods developed after 2012

Year	Type of cell	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Brief observations	Reference
2012	HCT8	<i>C. parvum</i>	87% of the <i>C. parvum</i> protein coding genome is detected 72 hours post-infection	[22]
2013	HCT8	<i>C. parvum</i>	Endoplasmic stress is induced upon <i>C. parvum</i> infection	[41]
2014	FHs 74 Int	<i>C. parvum</i>	Higher levels of infection compared to cancer cell line	[23]
2014	HCT8	<i>C. parvum</i>	Electrical-impedance device for real-time monitoring of <i>C. parvum</i> infection	[35]
2015	HCT8	<i>C. parvum</i>	12h is the time needed for <i>Cryptosporidium</i> to bind to host cells	[33]
2015	HEK293	<i>C. parvum</i>	TLR2 and TLR4 are used to recognize and respond to infection	[32]
2015	HCT8	<i>C. parvum</i>	CDPK1 is not essential for <i>C. parvum</i> host invasion and growth	[37]
2017	HCT8	<i>C. parvum</i> and <i>C. hominis</i>	Auranta 3001 attenuate the entry of <i>Cryptosporidium</i> into host cells	[38]

Abbreviations: HCT8 (human ileocecal adenocarcinoma), FHs74 Int (fetal human intestinal cells), HEK293 (human embryonic kidney cells)

Cryptosporidium axenic culture assays

It was believed that an in-vitro cell-free *Cryptosporidium* culture model may help in understanding the developmental biology and pathogenesis of this parasite [42]. While the first study reporting the completion of the life cycle of *C. parvum* media devoid of host cells was published in 2004 [42], it was not until 2009 that the multiplication of *C. parvum* DNA from cultures in the absence of host cells was reported, although this multiplication was far from optimal [43]. Because most of the *C. parvum* life cycle is intracellular, the description of development outside the host cell was unexpected [43] and considered controversial. Multiplication of *Cryptosporidium* DNA from cell-free cultures was reported by others [43–45]. However, other investigators such as Girouard *et al.* who used similar but not identical serum-free cultivation systems, were unable to reproduce these results [46].

One of the major limitations in the identification of the life-cycle stages of the parasite in cell-free culture was the dispersion of the parasite in the culture medium [33]. However, the characterization of these life-cycle stages was possible with Crypto-Cel (a monoclonal antibody preparation directed against the oocyst wall) and Sporo-Glo (a monoclonal antibody preparation directed against sporozoites) labeling methods providing proof of the ability of *Cryptosporidium* to multiply and propagate in an axenic culture [42, 47]. In the same study, the demonstration of multiplication of parasites was confirmed by qPCR, which revealed a significant increase in parasite DNA after 9 days in culture inoculated with excysted oocysts or sporozoites. The life cycle and all the described developmental stages of *C. hominis* were observed when excysted oocysts or purified oocysts were used. Another interesting finding of this study was the visualization of trophozoites and meronts developing inside of unexcysted oocysts. Although this observation was described previously [48], it still remains unclear. Recently, the presence of sexual development stages of *C. parvum* was investigated in a cell-free culture system using TEM [49]. The sexual development stage started within 1/2-12h after oocyst inoculation, and newly formed oocysts could be detected 120h post-inoculation. In addition, various *Cryptosporidium* developmental stages (sporozoites, trophozoites, large meronts, merozoites, microgamonts, gamont-like cells and extra-large gamont-like cells) were identified in biofilms using various techniques including scanning electron microscopy (SEM) [45, 50].

The description of the complete development for two species of *Cryptosporidium* (*C. parvum* and *C. hominis*) in cell-free culture highlights new data related to the biological cell cycle of the

parasite. In fact, according to some authors, *Cryptosporidium* can be considered a gregarine due to its ability to complete the life cycle in the absence of host cells, the presence of extracellular gamont-like stages, the process of syzygy where two mature trophozoites pair up before the formation of a gametocyte, and finally the ability to adapt to its environment [49, 51, 52]. Tyzzer was first to suggest that, by undergoing the greater part of its development either attached to the surface of the epithelium or free in the lumen of the gastric glands, *Cryptosporidium* could be related to the microorganisms of the order Gregarina [53]. Based on the observations of extracellular development, Borowski *et al.* (2008) proposed that *Cryptosporidium* probably adapts to an intracellular lifestyle in host tissues to escape the immune response, and that the extracellular development of *Cryptosporidium* might be considered a retention of an ancestral phase in the life cycle [54]. Similar observations were described by Beyer *et al.* [55] in calves. The similarities between gregarines and *Cryptosporidium* were described in details in a recent article [56].

Reports on cell-free cultures have remained controversial. This axenic culture method of *Cryptosporidium* has yet to be accepted as a routine *in-vitro* culture system. In addition, considering that culture systems are intended to help in understanding the host-parasite interaction, this type of cell-free culture is unable to provide such help. Therefore, the cell-free culture could not contribute to understanding the mechanisms by which the parasite is able to infect humans and animals.

Cryptosporidium 3D and tissue culture

As mentioned previously, the molecular pathogenesis of *Cryptosporidium* has been extensively studied in two-dimensional (2D) cell monolayers. However, cell culture models of cryptosporidial infection have been limited by the lack of close approximation to the human or animal intestinal environment and the variability of physiological responses to the pathogen. These models of infection can barely mimic the physiological environment of the *in-vivo* models. In fact, conventional monolayer cell cultures are proven to support parasite infection, but are unable to form the tissue structures and complex microenvironment, and therefore, their translational utility is limited. Then, cultivation in a three-dimensional (3D) culture system has emerged as an approach to overcome certain limitations of 2D assays. Another problem of cell assays is related to the fact that not all *Cryptosporidium* species can undergo development in a cell culture. For instance, the sporozoites of *C. baileyi*, one of three avian *Cryptosporidium* spp., did not undergo development in primary cell cultures from either avian or mammalian cell lines. This parasite can cause severe respiratory infections with high morbidity and mortality in birds, especially in broiler chickens [57]. The complete development of *C. baileyi* in *in vitro* cultivation has been described in chorioallantoic

membranes of chick embryos after inoculation of sporozoites or oocysts into the allantoic cavity [58]. The authors used transmission electron microscopy (TEM) as convincing evidence of *Cryptosporidium* developmental stages.

Table 2. Summary of *Cryptosporidium* 3D culture methods developed after 2012

Year	Type	Inoculum	Time in culture	Parasite multiplication	Observations	Ref
2000	Organoid HCT8	10 ⁵ oocysts	48 hrs	Yes	Blunting of microvilli and disruption of tight junctions	[59]
2013	PEC	2*10 ⁴ sporozoites	5 days	Yes	Improved tool for studying host-parasite interaction	[60, 61]
2016	Hollow-fiber HCT8	Different concentrations	>6 months	Yes	High numbers of <i>in-vitro</i> cultured <i>C. parvum</i> oocysts	[62]
2016	Enteroids developed from crypts/villus of immunocompetent adult mice	10 ⁵ oocysts	48 hrs	Yes	Inhibition of <i>ex vivo</i> propagation of enteroids	[63]
2017	3D silk scaffold Caco 2/HT29 cells	10 ⁶ oocysts or 4.10 ⁶ sporozoites	15-17 days	Yes	Longest continuous <i>C. parvum</i> infection in a static <i>in-vitro</i> culture model	[64]

Abbreviations: HCT8 (human ileocecal adenocarcinoma), PEC (primary human epithelial cells), Caco2 (human colonic adenocarcinoma), HT29 (Human colonin adenocarcinoma).

Recently, in order to establish a continuous culture of *C. parvum*, a new model of 3D cell culture was tested by applying hollow-fiber technology [62]. Briefly, the previously established hollow-fiber technology [65] was adapted to mimic the physiology of a gut; the HCT-8 cells were then used to provide a host cell layer on the extracapillary surface of the fibers. This system provided two separate environments: an aerobic nutrient supply to the host cells, and an anaerobic nutrient supply to the parasite.

Additionally, the low redox environment of the media supplemented with a mix of lipids, improved the development of the parasite significantly. Using this technique, parasites were maintained in culture for >6 months, producing approximately 1×10^8 oocysts $\text{ml}^{-1} \text{day}^{-1}$, compared with a yield of 1×10^6 - oocysts per ml in day^{-1} in 2D cultures [62].

Nowadays, this technology can be considered as a long-term *in vitro* culture of the parasite, hence allowing the possibility to perform drug assays. This system provides a unique method for high parasite production and continuous propagation, but it requires specialized equipment and is not easily scaled to be used as an experimental system for drug screening. Another limitation is that this culture process takes place in the “black box” structure that makes it difficult to observe the host-parasite interaction.

The organoid models have emerged as an alternative to the models described previously. The organoid technology developed by Clevers *et al.* (2009) is a 3D culture system of whole intestinal crypts but also of single intestinal stem cells [66, 67]. Organoids growing in culture recapitulate the cellular hierarchy of the epithelium *in vivo* with all lineage cells and form a polarized epithelial layer surrounding a functional lumen. Stem cells are localized in crypt-like budding compartments and differentiated non-dividing cells move into villus-like regions, where they are finally shed into the enclosed central lumen. To initiate this culture model, crypts (or stem cells) are isolated from *ex-vivo* intestinal tissue and are seeded in Matrigel and overlaid with either serum-free culture medium supplemented with recombinant EGF, R-Spondin1 and Noggin (Clevers methodology), or a conditioned medium from cell lines expressing essential growth factors (alternative cheaper Myoshi's methodology). The culture medium is renewed and organoids are passaged regularly. Nevertheless, it is important to distinguish between the different terms used when describing the 3D culture. For instance, when the 3D culture is derived from induced pluripotent cells in specific culture conditions, it is called “induced intestinal organoid” [68]. The first organoid induced model that was infected by *Cryptosporidium* was developed using HCT-8 cells [59]. HCT-8 cells were grown in reduced-gravity, low-shear, rotating-wall vessel (RWV) system. This system was developed by NASA initially as a way to model the microgravity environment encountered in space and to investigate growth, regulatory and structural processes [69, 70]. The RWV bioreactor was

found to create a modeled microgravity, low fluid-shear environment that provides the necessary oxygenation and nutrients for cellular development and polarization [70]. In contrast to the cell monolayer system, in this environment, cells were observed to form cellular structures and features, hence shaping 3D tissue-like aggregates in contrast to cell monolayers. Since its development, the RWV bioreactor has been utilized for the study of cellular and microbial gene expression in microgravity, cellular differentiation, host-pathogen interactions and tissue engineering [70]. Upon *C. parvum* infection, the organoids showed blunting of microvilli and disruption of tight junctions. These observations are consistent with what has been described so far *in vivo* and in biopsy specimens of infected patients. Quantification of infection by real-time PCR showed a 70-fold increase from 6 to 48 hours of incubation. Infection was decreased to 0 after 96 hours PI, possibly due to apoptosis of infected HCT-8 cells and detachment of even viable cells during infection [71]. In fact, organoids (or gastroids, enteroids or colonoids according to the digestive tract region) appear to be a valuable new model for studying *Cryptosporidium*–host cells interactions.

In another study, the effects of *C. parvum* infection were tested on the *ex-vivo* development of enteroids from immunocompetent mice [63]. In order to develop enteroids for the *ex-vivo* infection, these authors isolated the crypt/villus units as previously described by Mahé *et al* [72]. The isolated crypts/villi were subsequently cultured in 3D gel culture dishes. The isolated crypts/villi developed into enteroids lined with a monolayer of cells showing subapical membrane staining of actin typical of polarized intestinal epithelium [63]. Interestingly, the immature intestinal epithelium showed a deficiency in clearance of *C. parvum* infection resulting in the susceptibility of this *ex-vivo* method to infection. After *C. parvum* infection, a significant inhibition of enteroid propagation and an increase in apoptotic cell death and cell senescence were observed. Furthermore, an increase in the level of Dickkopf-related protein 1 and a decrease in the level of Wnt family member 5a were detected in enteroids after infection. They hypothesize that *C. parvum* infection may inhibit intestinal stem-cell function through attenuation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Interestingly, such an alteration was previously described in SCID mice infected with *C. parvum* [73, 74]. However, in this latter study, the authors described the development of a high-grade neoplasia in the ileocecal region of mice associated with an activation of the Wnt pathway [75]. Recently, a novel bioengineered 3D human intestinal model for long-term infection of *C. parvum* was developed [64]. For this purpose, a 3D silk scaffold was generated and the fabrication method resulted in a scaffold consisting of a hollow channel space and a bulk space with interconnected pores surrounding the channel. Caco-2 and HT29-MTC cells were sheltered in the 3D scaffolds, whereas the H-InMyoFibs were implanted in the porous bulk. All of these cell lines are derived from human colon cancer. This 3D model has specific features mimicking the architecture of the human small intestine, with highly polarized

monolayers characterized by microvilli with continuous brush borders and the formation of tight junctions. Four million sporozoites were used to inoculate the lumen of the scaffolds for 2 hours without culture medium. This model supported *C. parvum* infections for at least 15 days. Unlike the other systems described here, this system is believed to be more suited to the study of host-parasite interaction, drug identification and transgenic parasite propagation.

The utility of these cell lines is, nonetheless, limited by the fact they are not derived from the small intestine and are transformed. The culture of primary human intestinal epithelial cells (PECs) that retain human characteristics would be an alternative for studying human intestinal infection. Short-term-cultured PECs have been previously reported as a suitable model to study *Cryptosporidium* [76] infection. However, cultured PECs are short-lived cells and undergo apoptosis when cultured *in vitro*. Recently, a long-term culture of PECs has been obtained [61]. The authors were able to maintain a 60-day culture of PECs using intact crypts and a culture medium supplemented with osteoprotegerin [77], Wnt activators include noggin and R-spondin [78, 79], and butyrate [80]. After infection with a low inoculum of *C. parvum* for 5 days, the parasite was able to complete its cycle. Therefore, this culture could provide an improved tool for studying host-parasite interaction in intestinal pathogens. Nonetheless, the use of this cell line is limited in other labs due to the Institutional Review Board (IRB).

Another *in-vitro* model based on chicken embryos was established to explore the *C. baileyi* infection [58]. In fact, chicken embryos were used for observing the endogenous development and pathogenicity of *Cryptosporidium* spp. and other protozoans [81, 82]. 9-day-old broiler chicken embryos were inoculated with 3.10^5 oocysts and incubated for 8 days. Not only were all the life stages of the parasite observed, but also an aggregation of trophozoites that adhered to each other with feeding organelles, and even developed without the invasion of the host cells. This study has described the development of *C. baileyi* in culture without host invasion, thus suggesting extracellular development of the parasite. Likewise, in a modified cell-free culture [48] and in chicken embryos, development with or without cell invasion may have occurred in synchrony. Compared to a previous study [81] in which the average of reproduction increased more compared to the reproduction of parasites, this may be due to the age of the embryos.

In a similar yet different approach, human explants were used to determine gene expression in response to *Cryptosporidium* infection [61]. The authors described that crypts isolated from human intestines growing in culture medium supplemented with growth factors and antiapoptotic molecules can support *Cryptosporidium* infection. Ileal tissue was obtained from 3 individuals undergoing surgical procedures for unrelated noninfectious conditions. The gene expression profiles were examined by microarray analysis using the GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array.

They showed that *Cryptosporidium* infects only epithelial cells and only a minority of the epithelial cells was infected. Furthermore, a significant overexpression of the PRE family receptor osteoprotegerin (OPG) was observed. Interestingly, the overexpression of OPG has been reported in cells under pathological conditions, such as cancer or inflammatory bowel disease [82]. Consistently, *C. parvum* was found to induce colic adenocarcinoma in immunosuppressed mice[83]. Another *ex-vivo in-vitro* model using explants derived from SIV-infected macaques was generated to study the role of substance P (SP) in the pathogenesis of cryptosporidiosis [84] SP is a neuropeptide and pain transmitter known to be associated with a number of diseases; SP is located in the gastrointestinal tract [85]. As a matter of fact, a previous study [86] demonstrated a role of SP in the intestinal pathophysiological alterations induced by *C. parvum* infection in immunocompetent macaques. The study using jejunal tissues from non-SIV-infected macaques is highly expensive, hence the need for an *ex-vivo* method. One cm of jejunal segments from experimental SIV-induced immunosuppression macaques was used for this study. Briefly, the authors were able to show that elevated SP expression was accompanied by increased intestinal electrophysiological alterations after *C. parvum* infection. By using an NK1R antagonist (a SP receptor), they were able to prevent such alterations. This antagonist can be used to control the chronic symptoms associated with this AIDS-associated disease.

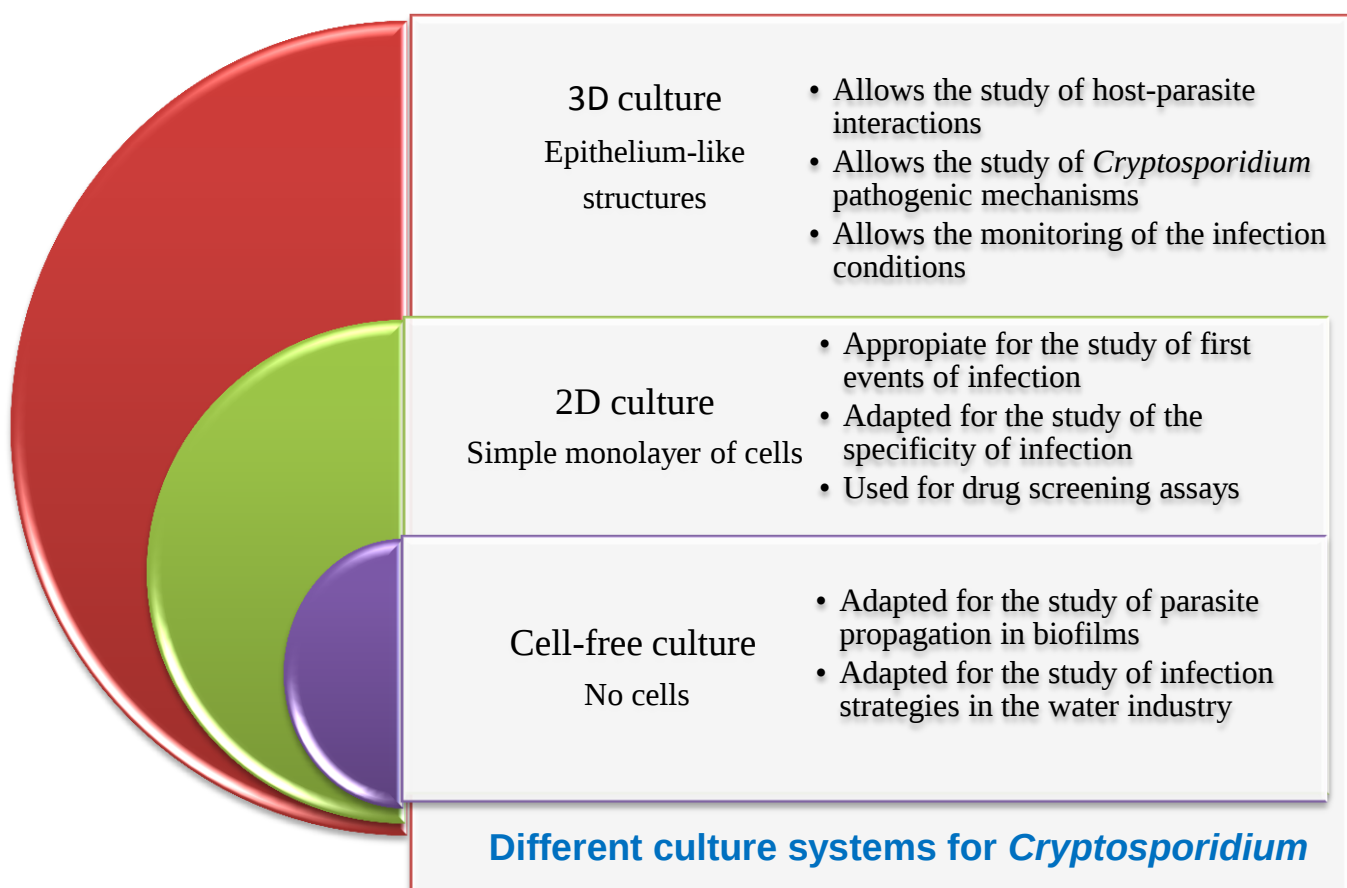


Figure 6. Summary of the advantages of each type of culture system for *Cryptosporidium*

Conclusions

The choice of the appropriate *Cryptosporidium* culture system is very much dependent on the biological question (Figure 1). For instance, the 3D culture, when compared to traditional 2D culture, seems to be useful to investigate the time-dependent cellular mechanisms and factors involved in the regeneration and degeneration of cells after parasite infection, facilitating the understanding of the host-parasite interactions. In fact, this 3D culture system better supports a productive pathogen infection and replication in an environment that mimics reality. However, despite considerable efforts to achieve *in-vitro* *Cryptosporidium* cultivation, several obstacles remain and further research is needed to optimize the systems further. Considering that cell fate *in vivo* is affected by external factors like the physical or chemical interface and interactions with other cells or matrixes [87], it is important to control these factors precisely, both spatially and temporally, when developing new *Cryptosporidium in-vitro* systems. In addition, further research should take into account that the real environment of an intestinal parasite relies on biotic and abiotic components, such as the commensal microbiota organized as a biofilm, the overlying mucus layer, and finally the tightly structure of the intestinal epithelium [88]. We also speculate that the integration of tissue engineering and microfluidic technologies could be a good strategy to consider in the design of more physiological models of *Cryptosporidium* culture. The progress in microfluidic cultures, especially the new microfluidic 3D model, has already elucidated questions in cell biology through the control of key biophysical and biochemical parameters of the *in-vivo* microenvironment. These 3D microfluidic devices provide a level of precision control that could not be achieved previously [87]. It is believed that, with the appropriate tools and research strategies, “the prevention of deaths caused by *Cryptosporidium* infections is a realistic goal” [16].

References

1. Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol*. 2010;124:80–9.
2. Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, Ostroff SM, Hughes JM. Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:225–30.
3. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet Lond Engl*. 2013;382:209–22.

4. Marcos LA, Gotuzzo E. Intestinal protozoan infections in the immunocompromised host. *Curr Opin Infect Dis.* 2013;26:295–301.
5. Bhadauria D, Goel A, Kaul A, Sharma RK, Gupta A, Ruhela V, et al. *Cryptosporidium* infection after renal transplantation in an endemic area. *Transpl Infect Dis Off J J Transplant Soc.* 2015;17:48–55.
6. Checkley W, White AC, Jaganath D, Arrowood MJ, Chalmers RM, Chen X-M, et al. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *Lancet Infect Dis.* 2015;15:85–94.
7. Shrivastava AK, Kumar S, Smith WA, Sahu PS. Revisiting the global problem of cryptosporidiosis and recommendations. *Trop Parasitol.* 2017;7:8–17.
8. Bouzid M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM. *Cryptosporidium* Pathogenicity and virulence. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26:115–34.
9. Certad G, Viscogliosi E, Chabé M, Cacciò SM. Pathogenic mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends Parasitol.* 2017;33:561–76.
10. Chappell CL, Darkoh C, Shimmin L, Farhana N, Kim D-K, Okhuysen PC, et al. Fecal indole as a biomarker of susceptibility to *Cryptosporidium* infection. *Infect Immun.* 2016;84:2299–306.
11. Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Res.* 2011;45:6603–14.
12. Benedict KM, Reses H, Vigar M, Roth DM, Roberts VA, Mattioli M, et al. Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water - United States, 2013-2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2017;66:1216–21.
13. Painter JE, Gargano JW, Yoder JS, Collier SA, Hlavsa MC. Evolving epidemiology of reported cryptosporidiosis cases in the United States, 1995-2012. *Epidemiol Infect.* 2016;144:1792–802.
14. Naumova EN, Egorov AI, Morris RD, Griffiths JK. The elderly and waterborne *Cryptosporidium* infection: gastroenteritis hospitalizations before and during the 1993 Milwaukee outbreak. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:418–25.
15. Manjunatha UH, Chao AT, Leong FJ, Diagana TT. Cryptosporidiosis drug discovery: Opportunities and Challenges. *ACS Infect Dis.* 2016;2:530–7.
16. Striepen B. Parasitic infections: Time to tackle cryptosporidiosis. *Nature.* 2013;503:189–91.
17. Janssen B, Snowden J. Cryptosporidiosis. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2017. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448085/>.
18. Karanis P, Aldeyarbi HM. Evolution of *Cryptosporidium* in vitro culture. *Int J Parasitol.* 2011;41:1231–42.
19. Karanis P. The truth about in vitro culture of *Cryptosporidium* species. *Parasitology.* 2017;;1–10.
20. Sifuentes LY, Di Giovanni GD. Aged HCT-8 cell monolayers support *Cryptosporidium parvum* infection. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:7548–51.

21. Ryan U, Hijjawi N. New developments in *Cryptosporidium* research. *Int J Parasitol.* 2015;45:367–73.
22. Mauzy MJ, Enomoto S, Lancto CA, Abrahamsen MS, Rutherford MS. The *Cryptosporidium Parvum* Transcriptome during In Vitro Development. *PLoS ONE.* 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0031715.
23. Varughese EA, Bennett-Stamper CL, Wymer LJ, Yadav JS. A new in vitro model using small intestinal epithelial cells to enhance infection of *Cryptosporidium parvum*. *J Microbiol Methods.* 2014;106:47–54.
24. Varughese EA, Kasper S, Anneken EM, Yadav JS. SHP-2 Mediates *Cryptosporidium parvum* infectivity in human intestinal epithelial cells. *PloS One.* 2015;10:e0142219.
25. Mele R, Gomez Morales MA, Tosini F, Pozio E. *Cryptosporidium parvum* at different developmental stages modulates host cell apoptosis in vitro. *Infect Immun.* 2004;72:6061–7.
26. Hijjawi NS, Meloni BP, Morgan UM, Thompson RC. Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. *Int J Parasitol.* 2001;31:1048–55.
27. Woods KM, Upton SJ. In vitro development of *Cryptosporidium parvum* in serum-free media. *Lett Appl Microbiol.* 2007;44:520–3.
28. Feng H, Nie W, Bonilla R, Widmer G, Sheoran A, Tzipori S. Quantitative tracking of *Cryptosporidium* infection in cell culture with cfse. *J Parasitol.* 2006;92:1350–4.
29. Witola WH, Zhang X, Kim CY. Targeted gene knockdown validates the essential role of lactate dehydrogenase in *Cryptosporidium parvum*. *Int J Parasitol.* 2017;47:867–74.
30. Hijjawi N. *Cryptosporidium*: New developments in cell culture. *Exp Parasitol.* 2010;124:54–60.
31. Garvey M, Stocca A, Rowan N. Development of a combined in vitro cell culture – Quantitative PCR assay for evaluating the disinfection performance of pulsed light for treating the waterborne enteroparasite *Giardia lamblia*. *Exp Parasitol.* 2014;144:6–13.
32. Yang Z, Fu Y, Gong P, Zheng J, Liu L, Yu Y, et al. Bovine TLR2 and TLR4 mediate *Cryptosporidium parvum* recognition in bovine intestinal epithelial cells. *Microb Pathog.* 2015;85 Supplement C:29–34.
33. Paziewska-Harris A, Singer M, Schoone G, Schallig H. Quantitative analysis of *Cryptosporidium* growth in in vitro culture—the impact of parasite density on the success of infection. *Parasitol Res.* 2016;115:329–37.
34. Shahiduzzaman M, Dyachenko V, Obwaller A, Unglaube S, Daugschies A. Combination of cell culture and quantitative PCR for screening of drugs against *Cryptosporidium parvum*. *Vet Parasitol.* 2009;162:271–7.
35. Dibao-Dina A, Follet J, Ibrahim M, Vlandas A, Senez V. Electrical impedance sensor for quantitative monitoring of infection processes on HCT-8 cells by the waterborne parasite *Cryptosporidium*. 2015.

36. Schupfner M, Greif G, Lendner M, Daugschies A, Lippuner C, von Samson-Himmelstjerna G, et al. Evaluation of putative anti-cryptosporidial drugs in an in vitro culture system. *Parasitol Res.* 2013;112 Suppl 1:149–62.
37. Kuhlenschmidt TB, Rutaganira FU, Long S, Tang K, Shokat KM, Kuhlenschmidt MS, et al. Inhibition of calcium-dependent Protein Kinase 1 (CDPK1) in Vitro by pyrazolopyrimidine derivatives does not correlate with sensitivity of *Cryptosporidium parvum* growth in cell culture. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;60:570–9.
38. Ch Stratakos A, Sima F, Ward P, Linton M, Kelly C, Pinkerton L, et al. The in vitro and ex vivo effect of Auranta 3001 in preventing *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* infection. *Gut Pathog.* 2017;9:49.
39. Ward HD. New Tools for *Cryptosporidium* Lead to new hope for cryptosporidiosis. *Trends Parasitol.* 2017;33:662–4.
40. Carey CM, Lee H, Trevors JT. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res.* 2004;38:818–62.
41. Morada M, Pendyala L, Wu G, Merali S, Yarlett N. *Cryptosporidium parvum* induces an endoplasmic stress response in the intestinal adenocarcinoma HCT-8 cell line. *J Biol Chem.* 2013;288:30356–64.
42. Hijjawi NS, Meloni BP, Ng'anzo M, Ryan UM, Olson ME, Cox PT, et al. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *Int J Parasitol.* 2004;34:769–77.
43. Zhang L, Sheoran AS, Widmer G. *Cryptosporidium parvum* DNA replication in cell-free culture. *J Parasitol.* 2009;95:1239–42.
44. Hijjawi N, Estcourt A, Yang R, Monis P, Ryan U. Complete development and multiplication of *Cryptosporidium hominis* in cell-free culture. *Vet Parasitol.* 2010;169:29–36.
45. Koh W, Thompson A, Edwards H, Monis P, Clode PL. Extracellular excystation and development of *Cryptosporidium*: tracing the fate of oocysts within *Pseudomonas* aquatic biofilm systems. *BMC Microbiol.* 2014;14:281.
46. Girouard D, Gallant J, Akiyoshi DE, Nunnari J, Tzipori S. Failure to propagate *Cryptosporidium* spp. in cell-free culture. *J Parasitol.* 2006;92:399–400.
47. Boxell A, Hijjawi N, Monis P, Ryan U. Comparison of various staining methods for the detection of *Cryptosporidium* in cell-free culture. *Exp Parasitol.* 2008;120:67–72.
48. Borowski H, Thompson RCA, Armstrong T, Clode PL. Morphological characterization of *Cryptosporidium parvum* life-cycle stages in an in vitro model system. *Parasitology.* 2010;137:13–26.
49. Aldeyarbi HM, Karanis P. The fine structure of sexual stage development and sporogony of *Cryptosporidium parvum* in cell-free culture. *Parasitology.* 2016;143:749–61.
50. Koh W, Clode PL, Monis P, Thompson RCA. Multiplication of the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* in an aquatic biofilm system. *Parasit Vectors.* 2013;6:270.

51. Aldeyarbi HM, Karanis P. Electron microscopic observation of the early stages of *Cryptosporidium parvum* asexual multiplication and development in in vitro axenic culture. *Eur J Protistol.* 2016;52:36–44.
52. Aldeyarbi HM, Karanis P. The Ultra-Structural Similarities between *Cryptosporidium parvum* and the Gregarines. *J Eukaryot Microbiol.* 2016;63:79–85.
53. Tyzzer EE. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (Gen. Et Sp. Nov.), of the gastric glands of the common mouse. *J Med Res.* 1910;23:487–510.3.
54. Borowski H, Clode PL, Thompson RCA. Active invasion and/or encapsulation? A reappraisal of host-cell parasitism by *Cryptosporidium*. *Trends Parasitol.* 2008;24:509–16.
55. Beyer TV, Svezhova NV, Sidorenko NV, Khokhlov SE. *Cryptosporidium parvum* (Coccidia, Apicomplexa): Some new ultrastructural observations on its endogenous development. *Eur J Protistol.* 2000;36:151–9.
56. Ryan U, Paparini A, Monis P, Hijjawi N. It's official - *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? *Water Res.* 2016;105:305–13.
57. Goodwin MA, Brown J, Resurreccion RS, Smith JA. Respiratory coccidiosis (*Cryptosporidium baileyi*) among northern Georgia broilers in one company. *Avian Dis.* 1996;40:572–5.
58. Huang L, Zhu H, Zhang S, Wang R, Liu L, Jian F, et al. An in vitro model of infection of chicken embryos by *Cryptosporidium baileyi*. *Exp Parasitol.* 2014;147:41–7.
59. Alcantara Warren C, Destura RV, Sevilleja JEAD, Barroso LF, Carvalho H, Barrett LJ, et al. Detection of epithelial-cell injury, and quantification of infection, in the HCT-8 organoid model of cryptosporidiosis. *J Infect Dis.* 2008;198:143–9.
60. Castellanos-Gonzalez A, Yancey LS, Wang H-C, Pantenburg B, Liscum KR, Lewis DE, et al. *Cryptosporidium* infection of human intestinal epithelial cells increases expression of osteoprotegerin: a novel mechanism for evasion of host defenses. *J Infect Dis.* 2008;197:916–23.
61. Castellanos-Gonzalez A, Cabada MM, Nichols J, Gomez G, White AC. Human primary intestinal epithelial cells as an improved in vitro model for *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun.* 2013;81:1996–2001.
62. Morada M, Lee S, Gunther-Cummins L, Weiss LM, Widmer G, Tzipori S, et al. Continuous culture of *Cryptosporidium parvum* using hollow fiber technology. *Int J Parasitol.* 2016;46:21–9.
63. Zhang X-T, Gong A-Y, Wang Y, Chen X, Lim S-YS, Dolata CE, et al. *Cryptosporidium parvum* infection attenuates the ex vivo propagation of murine intestinal enteroids. *Physiol Rep.* 2016;4.
64. DeCicco RePass MA, Chen Y, Lin Y, Zhou W, Kaplan DL, Ward HD. Novel bioengineered three-dimensional human intestinal model for long-term infection of *Cryptosporidium parvum*. *Infect Immun.* 2017;85.
65. Rosenberg J, Sorenson J, Veeramallu U, Gebhard T. Use of hollow fiber technology for large scale production of viruses and viral antigens. *Am Biotechnol Lab.* 1990;8:34–9.

66. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 2009;459:262–5.
67. Dutta D, Clevers H. Organoid culture systems to study host–pathogen interactions. *Curr Opin Immunol*. 2017;48 Supplement C:15–22.
68. Stelzner M, Helmrath M, Dunn JCY, Henning SJ, Houchen CW, Kuo C, et al. A nomenclature for intestinal in vitro cultures. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2012;302:G1359–63.
69. Schwarz RP, Goodwin TJ, Wolf DA. Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: an application of simulated microgravity. *J Tissue Cult Methods Tissue Cult Assoc Man Cell Tissue Organ Cult Proced*. 1992;14:51–7.
70. Barrila J, Radtke AL, Crabbé A, Sarker SF, Herbst-Kralovetz MM, Ott CM, et al. Organotypic 3D cell culture models: using the rotating wall vessel to study host-pathogen interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8:791–801.
71. Di Genova BM, Tonelli RR. Infection strategies of intestinal parasite pathogens and host cell responses. *Front Microbiol*. 2016;7:256.
72. Mahe MM, Sundaram N, Watson CL, Shroyer NF, Helmrath MA. Establishment of human epithelial enteroids and colonoids from whole tissue and biopsy. *J Vis Exp JoVE*. 2015.
73. Certad G, Creusy C, Ngouanesavanh T, Guyot K, Gantois N, Mouray A, et al. Development of *Cryptosporidium parvum*-induced gastrointestinal neoplasia in severe combined immunodeficiency (SCID) mice: severity of lesions is correlated with infection intensity. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82:257–65.
74. Certad G, Creusy C, Guyot K, Mouray A, Chassat T, Delaire B, et al. Fulminant cryptosporidiosis associated with digestive adenocarcinoma in SCID mice infected with *Cryptosporidium parvum* TUM1 strain. *Int J Parasitol*. 2010;40:1469–75.
75. Benamrouz S, Conseil V, Chabé M, Praet M, Audebert C, Blervaque R, et al. *Cryptosporidium parvum*-induced ileo-caecal adenocarcinoma and Wnt signaling in a mouse model. *Dis Model Mech*. 2014;7:693–700.
76. Hashim A, Mulcahy G, Bourke B, Clyne M. Interaction of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* with primary human and bovine intestinal cells. *Infect Immun*. 2006;74:99–107.
77. Vidal K, van den Broek P, Lorget F, Donnet-Hughes A. Osteoprotegerin in human milk: a potential role in the regulation of bone metabolism and immune development. *Pediatr Res*. 2004;55:1001–8.
78. Ootani A, Li X, Sangiorgi E, Ho QT, Ueno H, Toda S, et al. Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nat Med*. 2009;15:701–6.
79. Haramis A-PG, Begthel H, van den Born M, van Es J, Jonkheer S, Offerhaus GJA, et al. De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science*. 2004;303:1684–6.

80. Peng L, Li Z-R, Green RS, Holzman IR, Lin J. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr*. 2009;139:1619–25.
81. Wunderlin E, Wild P, Eckert J. Comparative reproduction of *Cryptosporidium baileyi* in embryonated eggs and in chickens. *Parasitol Res*. 1997;83:712–5.
82. Pettersen I, Bakkelund W, Smedsrød B, Sveinbjørnsson B. Osteoprotegerin is expressed in colon carcinoma cells. *Anticancer Res*. 2005;25:3809–16.
83. Certad G, Ngouanesavanh T, Guyot K, Gantois N, Chassat T, Mouray A, et al. *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma. *Infect Agent Cancer*. 2007;2:22.
84. Garza A, Lackner A, Aye P, D'Souza M, Martin P, Borda J, et al. Substance P receptor antagonist reverses intestinal pathophysiological alterations occurring in a novel ex-vivo model of *Cryptosporidium parvum* infection of intestinal tissues derived from SIV-infected macaques. *J Med Primatol*. 2008;37:109–15.
85. Vilisaar J, Arsenescu RI. Roles of Substance P in Gastrointestinal Functions and Neuroimmune Interactions. In: *Neuro-Immuno-Gastroenterology*. Springer, Cham; 2016. p. 53–73. doi:10.1007/978-3-319-28609-9_4.
86. Hernandez J, Lackner A, Aye P, Mukherjee K, Tweardy DJ, Mastrangelo M-A, et al. Substance P is responsible for physiological alterations such as increased chloride ion secretion and glucose malabsorption in cryptosporidiosis. *Infect Immun*. 2007;75:1137–43.
87. Yi L, Lin J-M. Development and Applications of Microfluidic Devices for Cell Culture in Cell Biology. *Mol Biol Open Access*. 2016;2017. doi:10.4172/2168-9547.1000182.
88. Allain T, Amat CB, Motta J-P, Manko A, Buret AG. Interactions of *Giardia* sp. with the intestinal barrier: Epithelium, mucus, and microbiota. *Tissue Barriers*. 2017;5:e1274354.

V. La microfluidique

La microfluidique est la science et la technologie des systèmes permettant de traiter ou de manipuler de petites quantités de fluides (10^{-9} à 10^{-18} litres) au travers de canaux allant d'une dizaine à une centaine de micromètres (Whitesides, 2006). En règle générale, les écoulements de ces fluides peuvent être mono ou multiphasiques, simples ou complexes, en flux ou en goutte. Une des premières applications de la microfluidique s'est basée sur la miniaturisation des techniques classiques d'analyse chimique telle que la chromatographie en phase liquide (Kessler and Manz, 1990) ou l'électrophorèse (Harrison *et al.*, 1992). La plupart des réactions biochimiques et des mécanismes biologiques *in vivo* se déroulent en milieux aqueux. Partant de là, toute approche technologique liée à la biologie englobe alors une part importante de mécanique des fluides. Les systèmes biomicrofluidiques permettent d'intégrer des fonctions de manipulation et d'analyse d'échantillons dans un environnement contrôlé pour des études biologiques (Figure V.1 d'après (Duval *et al.*, 2017)).

La culture cellulaire est un outil indispensable à l'étude du comportement cellulaire et moléculaire dans un état physiologique normal ou dans le cas de pathologies. Depuis plus d'un siècle, la culture 2D a permis des avancées importantes dans la compréhension de la différenciation cellulaire, la migration, le développement et les interactions hôte-parasite (Huh *et al.*, 2011). L'étude de ces mécanismes a été primordiale dans notre compréhension de l'*in vivo*. Bien que les approches de la culture 2D soient largement utilisées, elles restent primitives et simples par rapport à la complexité de l'*in vivo* (Laschke and Menger, 2017). En effet, l'architecture spécifique de l'*in vivo*, les interactions entre les différents types de cellules et entre les cellules et leur microenvironnement ne sont pas reproduites dans une culture en monocouche sur du plastique ou du verre (Weigelt *et al.*, 2014). La naissance de la culture 3D vient alors combler une partie des disparités existantes entre l'*in vitro* et l'*in vivo*.

Il existe plusieurs différences entre la culture 2D et la culture 3D, la plus importante étant l'interaction des cellules avec leur microenvironnement (Figure V-1). En effet, pour reproduire au mieux la complexité des interactions cellulaires dans les fonctions des tissus *in vivo*, il a été nécessaire d'élaborer un modèle de culture représentatif de leur microenvironnement, notamment de la topologie des lieux (3D) et des écoulements locaux (composition et vitesse). Cependant, les cultures 3D classiques sont souvent confrontées à des difficultés techniques lors de la création de microenvironnements dynamiques complexes et bien contrôlés. *In vivo*, les différents éléments du microenvironnement sont en interaction étroite définissant alors une dynamique complexe (Gilgenkrantz, 2014). Si l'on se focalise sur la culture 3D, la microfluidique offre des avantages

importants pour la culture cellulaire 3D (Morimoto *et al.*, 2015). D'une part, on peut créer une plateforme dynamique, hautement complexe, contrôlable, reproductible et optimisée pour instaurer un microenvironnement qui mime au plus près les conditions *in vivo* (Kovarik *et al.*, 2012). D'autre part, on peut contrôler avec beaucoup de précision et à l'échelle du micromètre (van Duinen *et al.*, 2015) un nombre important de paramètres essentiels à la culture cellulaire 3D comme l'alimentation en oxygène et/ou le renouvellement du milieu de culture par perfusion, ceci bien entendu, dans un environnement stérile. En effet, le caractère différenciant de la microfluidique réside dans sa capacité intrinsèque à permettre la parallélisation des expériences et de pouvoir imposer de manière simultanée ou indépendante différents paramètres tels que, le débit, la distribution des nutriments ou le niveau d'oxygénation tout en permettant l'utilisation de l'imagerie ou la mesure en temps réel des événements cellulaires et moléculaires (Bhatia and Ingber, 2014).

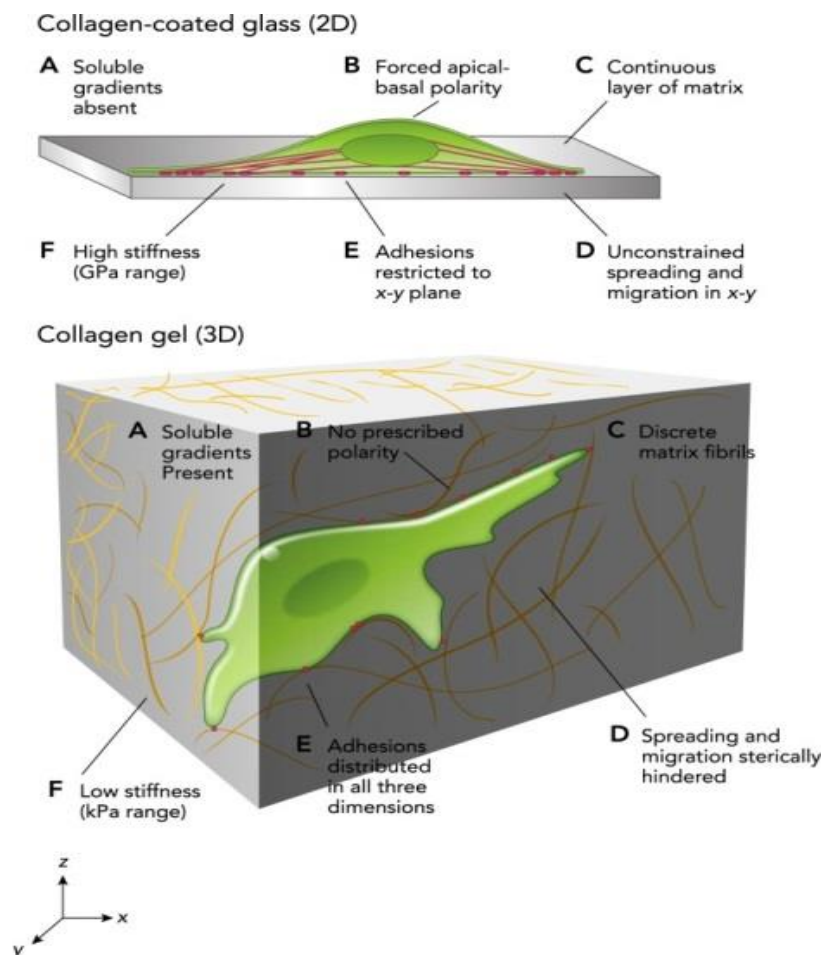


Figure V-1 Comparaison entre les microenvironnements dans une culture 2D et une culture 3D. Le gradient de facteurs solubles (A) est absent dans un environnement 2D alors qu'il est maintenu dans une culture 3D. (B) la polarité cellulaire est imposée en culture 2D alors qu'elle ne l'est pas en culture 3D. (C) Les cellules en culture 2D sont adhérentes tout le long du support utilisé pour la culture, alors qu'en 3D l'adhésion est limitée à l'environnement de culture. (D) les forces d'adhésion et de migration sont spatialement contrôlées en 3D alors qu'elles ne le sont pas en 2D. (E). L'adhésion cellulaire est distribuée sur les plans X, Y et Z en 3D alors qu'elle est distribuée uniquement sur X et Y en 2D. (F) le support de culture est rigide en 2D et souple en 3D. (Duval *et al.*, 2017).

1 Petites dimensions compatibles avec l'échelle de l'*in vivo*

Les dimensions à l'échelle du micromètre propres aux dispositifs microfluidiques sont compatibles avec celles des environnements *in vivo* et des nombreuses microstructures qui les composent (Miura and Yokokawa, 2016). De plus, les dispositifs microfluidiques se contentent de petits volumes de réactifs, ce qui réduit considérablement les coûts des expériences. Enfin, la technologie microfluidique permet d'assurer un renouvellement continu du milieu de culture (Li *et al.*, 2017). Ce renouvellement de fluide est, d'une manière classique, réalisé par un débit ou une pression appliquée à l'entrée ou à la sortie du microcanal. La gestion des flux se fait par utilisation d'un actionneur externe (par exemple une pompe péristaltique ou une pousse seringue) ou interne (par exemple par une pompe péristaltique intégrée aux capillaires) au microsystème. Un exemple très utilisé est celui développé par Quake aux Etats-Unis (Unger *et al.*, 2000). Une micropompe intégrée est formée par un réseau de capillaires en polymère que l'on peut déformer localement par mise sous pression d'air d'un second réseau de capillaires situé au-dessus du premier, entraînant, dans un mouvement péristaltique lié à l'actionnement séquentiel de plusieurs valves, la circulation de fluide dans les canaux. Deux paramètres sont réglés dans ce cas : l'ordre d'activation des vannes qui impose le sens de circulation du fluide alors que la longueur du cycle d'activation des vannes imposera la vitesse du fluide. Ces deux paramètres permettent un contrôle précis des fluides et de la distribution spatiale des gaz et molécules qu'ils transportent dans diverses chambres et canaux. En effet, à ces dimensions, les écoulements sont très souvent de nature laminaires. Il est donc possible de créer des gradients de concentrations d'espèces chimiques ou biologiques dans la direction normale à l'écoulement par phénomène de diffusion. Bien que la diffusion soit un phénomène lent aux températures d'utilisation de ces dispositifs, les petites dimensions permettent de garantir des niveaux de concentration supérieurs aux seuils des différents mécanismes de communication intra et inter-cellulaires en respectant les constantes de temps de l'*in vivo*. Il est cependant très important de connaître les effets propres à cette échelle pour pouvoir dimensionner correctement la géométrie et les débits des liquides circulants dans ces modèles qui dépendent de la densité, de la tension de surface et de la viscosité du liquide.

2 Organisation dans l'espace de différents types cellulaires

Un organe est un ensemble de tissus assurant une fonction physiologique précise. En effet, l'interaction cellulaire est un phénomène crucial pour la fonction physiologique normale d'un tissu. Cette interaction est possible entre des cellules d'un même phénotype ou des cellules de phénotypes différents. Une caractéristique importante dans l'implémentation de la microfluidique est la capacité de combiner plusieurs types de cellules dans un même espace de culture. Cette étape a déjà été

réalisée à plusieurs reprises (van der Helm *et al.*, 2016; van der Meer *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2013; Ziegler *et al.*, 2011). Il s'agit en effet d'une co-culture de deux types cellulaires séparés dans la plupart des cas par une membrane millipore. Une autre technique de co-culture développée en 2013 par Wagner *et al* (Wagner *et al.*, 2013) a permis d'intégrer deux modes de culture dans un même dispositif. L'interaction entre les différents modes de culture est maintenue grâce à un système de réseaux microfluidiques. D'autre part, la technique de co-culture de différentes lignées cellulaires a été utilisée pour examiner l'interaction organe-organe (Bricks *et al.*, 2014). Récemment, cette même technique a été utilisée pour une co-culture de foie-intestin et foie-peau (Maschmeyer *et al.*, 2015). Les développements de co-culture de rein-cœur, rein-intestin, rein-peau (Bagherifard *et al.*, 2016; Küchler *et al.*, 2013; Mathur *et al.*, 2013) ont été motivés surtout pour les tests de molécules à visée thérapeutique en complément des tests sur animaux. Cette technique est particulièrement intéressante puisqu'elle permet de comprendre l'interaction de différents types de cellules pour une même substance testée. La capacité d'organiser dans l'espace les différents types de cellules est confrontée quand même à un problème majeur qui est la nécessité de mettre en place un système de circulation du milieu de culture optimisé. En effet, avec plusieurs types de cellules, on doit mettre en œuvre plusieurs types de milieux de culture puisque chaque type de cellule nécessite un milieu de culture contenant différents nutriments lui assurant une croissance et une physiologie normale d'après les pratiques de la culture 2D. On peut néanmoins se poser la question de la composition du milieu de culture à ces échelles et peut-être envisager la possibilité de modifier cette composition, voire d'uniformiser le milieu de culture quel que soit le type cellulaire. Mais ceci dépasse le cadre de cette thèse. Les autres défis qui doivent être adressés sont le volume du milieu de culture, la taille des pores de la membrane supportant la biopsie dans le cas de notre travail et le débit du milieu de culture. La conception des systèmes microfluidiques doit respecter le rapport volume-cellule tout en assurant une bonne concentration des métabolites et des facteurs paracrines et autocrines.

3 Notions de création de gradient

Avec la microfluidique, on peut générer un flux à l'intérieur des microcanaux permettant en conséquence le contrôle spatial des gradients de facteurs solubles dans la culture. Ce contrôle est assuré par une fusion ou une division de deux flux, au minimum, de compositions chimiques, biologiques ou physiques différentes (Khademhosseini *et al.*, 2006) (Figure V-2). La création de gradients a été utilisée pour élucider des interactions biologiques complexes. En effet, les techniques de culture classiques sont limitées dans la création d'un gradient de facteurs solubles (Miura and Yokokawa, 2016). Cependant, avec l'explosion de la recherche dans le domaine de la microfluidique

au cours des dernières années, de tels paramètres sont continuellement optimisés pour atteindre des conditions adéquates pour divers types de cellules (Alicia *et al.*, 2016). La génération de gradient est également intéressante pour comprendre, par exemple l'interaction spécifique entre les cellules et la matrice extracellulaire (Gunawan *et al.*, 2006). Cependant, comme le gradient est fixé d'une manière générale dans une direction orthogonale à l'écoulement et donc à la géométrie de la chambre, les dispositifs classiques ne sont pas capables de fournir des données sur la réponse cellulaire si les gradients se déplacent ou changent de direction. Récemment, un dispositif microfluidique a été développé de façon à fournir un écoulement à 360° (Nakajima *et al.*, 2016). Ce dispositif est intéressant puisqu'il fournit des données sur la migration cellulaire pluridirectionnelles dans le cas des cancers par exemple. Les dispositifs microfluidiques peuvent alors facilement créer de complexes environnements dynamiques à micro-échelle pour imiter les environnements 3D *in vivo*. La conception des systèmes microfluidiques permet aussi l'introduction simultanée de doses multiples de différents produits dans le même milieu de culture validant alors la possibilité de l'utilisation de la technologie microfluidique pour le criblage de chimiothèques ou le test de drogues (Kashaninejad *et al.*, 2016).

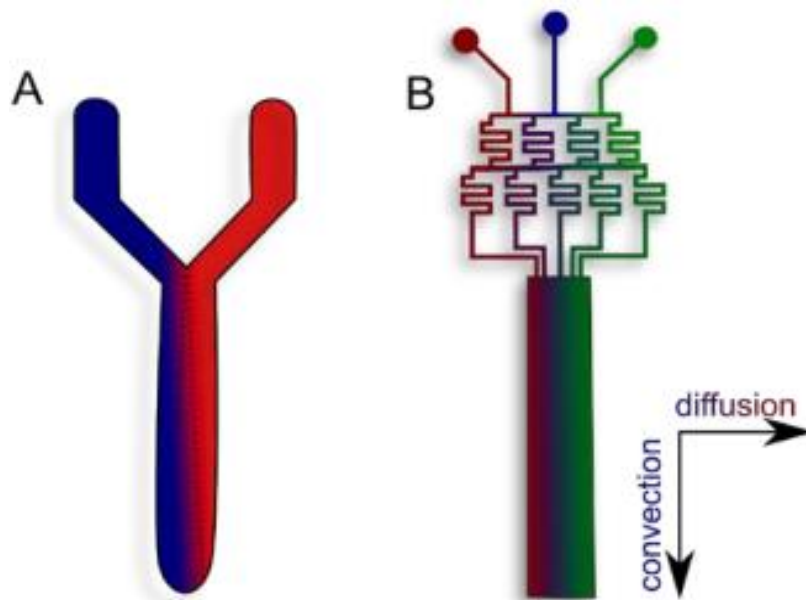


Figure V-2 deux dispositifs microfluidiques pour générer un gradient de concentration par écoulement (diffusion et convection) (A) Système microfluidique en forme de Y, dans lequel le gradient de diffusion est généré dans la section transversale du microcanal, (B) système microfluidique avec plusieurs microcanaux, appelé «arbre de Noël», créant un gradient uniforme. (Oliveira *et al.*, 2016)

4 Notions de contrainte de cisaillement

Dans notre corps, plusieurs types de cellules répondent différemment à des stimuli chimiques ou physiques différents. Par définition, une contrainte de cisaillement est créée lorsqu'une force tangentielle agit sur une surface (Oliveira *et al.*, 2016). En biologie la contrainte de cisaillement est créée lorsque la force de frottement d'un écoulement de fluide est appliquée sur des cellules ou des tissus. *In vivo*, la contrainte de cisaillement est principalement due à la force de frottement du flux sanguin contre les parois du vaisseau (Chiu and Chien, 2011). *In vivo*, certaines cellules (cellules épithéliales et cellules endothéliales rénales) sont continuellement soumises à des contraintes de cisaillement. Cependant, ces contraintes de cisaillement dépendent du type de flux. Par exemple, dans les veines et les petites artères où les fluides sont généralement laminaires, les contraintes de cisaillement sont importantes alors que dans les branches pulmonaires où l'écoulement est perturbé, les contraintes de cisaillement sont faibles (Mina *et al.*, 2017). De même, les cellules tumorales en métastase sont soumises à des contraintes de cisaillement lorsqu'elles migrent vers d'autres organes en traversant les vaisseaux lymphatiques et le système vasculaire de l'hôte. Ainsi, ces contraintes de cisaillement peuvent influencer leur phénotype (Gayer and Basson, 2009). Dans les cultures 2D traditionnelles, cette contrainte de cisaillement ne peut pas être appliquée. Les dispositifs microfluidiques s'avèrent être plus adéquats pour ce type d'étude (Polacheck *et al.*, 2013). Il est donc primordial que des efforts de recherche soient consacrés au développement d'une vascularisation *in vitro* la plus réaliste possible permettant de prendre en compte la complexité de l'épithélium intestinal dans l'*in vivo*. Ces systèmes devront prendre en considération le péristaltisme intestinal, la nature de l'écoulement, les forces de cisaillement et l'apport en oxygène (Blutt *et al.*, 2017).

5 Facilité de l'analyse fonctionnelle

La microfluidique met en place des technologies permettant une réduction d'échelle allant jusqu'au micromètre. Cependant, cette réduction d'échelle ne signifie pas une introduction de nouvelles notions d'interactions physiques ou chimiques mais plutôt une meilleure représentation de l'équilibre entre ces interactions. Un avantage essentiel de la microfluidique est sa capacité à contrôler les conditions de culture dans des dimensions géométriques mimétiques et pour un coût expérimental maîtrisé. Ceci est dû, non seulement, au volume du milieu utilisé, mais aussi, au recyclage et à la réutilisation du dispositif (Liu *et al.*, 2015). Un autre facteur de réduction du coût expérimental est le fort potentiel d'automatisation de ces plateformes d'essai (Novo *et al.*, 2013). D'autre part, la plupart des incubateurs utilisés en culture cellulaire sont des incubateurs humides à

37°C et 5% CO₂, d'où la nécessité de mettre en place des dispositifs microfluidiques perméables. Il faut donc pour réaliser ceux-ci disposer d'un matériau perméable à l'Oxygène et au CO₂, bio-compatible. Ces dispositifs microfluidiques doivent également permettre des observations ou des manipulations *in situ* à l'échelle cellulaire. Il est ainsi possible d'analyser, en temps réel, la réponse cellulaire à un stimulus chimique par microscopie (Holton *et al.*, 2017). Par conséquent, l'utilisation d'un matériau transparent et ayant un indice faible d'autofluorescence représente également un critère déterminant lors de la fabrication des dispositifs microfluidiques (Velve-Casquillas *et al.*, 2010). Ces caractéristiques essentielles (Mäki *et al.*, 2015) sont toutes présentes dans le polydiméthylsiloxane (PDMS) qui se trouve par conséquent être l'élastomère le plus couramment utilisé dans la fabrication de ces dispositifs.

D'autre part, grâce à la microfluidique, il est également possible de manipuler une seule cellule, d'en extraire le contenu protéique, de marquer les protéines, de les séparer et de les quantifier. Des études ont permis de mettre en évidence que les cellules d'une même lignée peuvent avoir des comportements différents et des variations phénotypiques dues à une différence dans l'expression des gènes (Levsky and Singer, 2003). Par conséquent, l'étude à l'échelle d'une cellule unique, grâce à la microfluidique permet de comprendre ces variations cellulaires. Cela a permis en 2007 de regarder, à l'échelle d'une cellule, la variation moléculaire de plusieurs protéines (Huang *et al.*, 2007). En 2012, Zheng *et al* ont pu cultiver d'une façon automatique une cellule unique isolée à partir de cellules issues de glandes mammaires (Zheng *et al.*, 2012). Un autre usage intéressant des dispositifs microfluidiques, toujours à l'échelle d'une cellule, est par exemple, l'étude des voies de signalisation intracellulaires (Tay *et al.*, 2010). Aujourd'hui, grâce à la techniques des gouttelettes microfluidiques (appelée microfluidique digitale), les chercheurs sont capables de caractériser l'activité de protéases à l'échelle d'une cellule et ce pour plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (Ng *et al.*, 2016).

La microfluidique s'avère donc un outil puissant pour le contrôle de l'environnement cellulaire et pour la caractérisation, à l'échelle moléculaire, des fonctions cellulaires d'un tissu. L'aspect microfluidique est dans ce cas particulièrement intéressant puisqu'il permet l'intégration, dans un seul et même dispositif, de plusieurs opérations successives d'un protocole complexe et lourd. Par exemple, la technologie microfluidique peut intégrer plusieurs étapes telles que la culture cellulaire, l'échantillonnage cellulaire, le contrôle de fluide, la capture de cellules, la lyse cellulaire, le mélange et la détection sur un seul appareil (Jang *et al.*, 2008).

6 Les applications microfluidiques dans la culture 3D

La culture 3D est un domaine axé sur le développement d'organoïdes, de biopsies ou de tissus qui reproduisent au plus près la fonction des tissus *in vivo*. La microfluidique apparaît comme un outil puissant pour la culture 3D (Huh *et al.*, 2011) et en pleine effervescence (Aziz *et al.*, 2017a). L'utilisation de la microfluidique est devenue rapidement l'une des approches les plus populaires pour la modélisation tissulaire *in vitro*. La microfabrication fournit un niveau de précision et de contrôle qui ne peut être atteint avec de nombreuses techniques décrites précédemment (Hsiao *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2007; Tourovskaia *et al.*, 2005). Ces systèmes sont personnalisables et attractifs pour des études nécessitant l'introduction de divers facteurs. Cela est fait avec une intervention humaine minimale et, par conséquent, réduit la variabilité dans les différentes expériences. La microfluidique permet de positionner, de façon précise, des cellules les unes par rapport aux autres et de contrôler le flux de façon à garantir une différenciation et une activité cellulaire sur une longue période de temps (Huh *et al.*, 2010). Les études prospectives, réalisées par des entreprises spécialisées dans l'étude du marché des microsystèmes, concluent que ces dispositifs font diffuser très fortement dans le domaine médical (FigureV-3). Les dispositifs microfluidiques appliqués à la culture 3D ont dépassé l'étape de la preuve de concept. Ils sont actuellement en cours de validation et ensuite passeront par les étapes de standardisation puis d'industrialisation. Ils seront alors communément utilisés pour réaliser des tests de toxicité et de dépistage. La Figure V-3 montre aussi que ces outils technologiques bénéficient aussi des progrès en biologie avec notamment la maîtrise de la programmation des cellules souches et donc leur possible intégration dans ces microsystèmes ouvrant ainsi la porte à une médecine personnalisée.

6,1 Création d'un tissu biologique structuré à partir de cellules adhérentes remises en suspension

L'ingénierie tissulaire crée des tissus qui visent à améliorer ou remplacer les tissus endommagés. Il est nécessaire donc de générer des structures occupant un volume conséquent qui simulent l'architecture complexe des organes *in vivo* avec respect des interactions cellulaires et d'une forte densité cellulaire. Une caractéristique primordiale pour cette création est la mise en place d'une vascularisation. En effet, la vascularisation permet l'échange de gaz ainsi que le transport de nutriments, des déchets, d'agents pathogènes etc. Un problème majeur dans beaucoup de constructions de tissus est l'absence d'une bonne vascularisation qui peut par conséquence induire une nécrose cellulaire (Ohayon *et al.*, 2008). Le développement d'échafaudages à base de modules élémentaires fonctionnels de plus petite taille constitués d'un hydrogel contenant un type cellulaire permet de contourner cet obstacle et de s'affranchir d'une vascularisation naturelle (He *et al.*, 2013).

Contrairement à la technologie qui consiste à produire un échafaudage poreux que l'on peuple avec des cellules à faible densité, les technologies à base d'hydrogel permettent de construire des assemblages avec de fortes densités cellulaires tout en maintenant leur viabilité (Elbert, 2011). L'hydrogel est le matériau le plus utilisé pour ce type de culture parce qu'il peut être manipulé différemment suivant le type de construction demandé (Zhou, 2017). En effet, le principal avantage des hydrogels est leur capacité à reproduire les structures de la matrice extracellulaire tout en assurant une porosité adéquate pour l'organisation cellulaire, la biocompatibilité et la rigidité représentative (Rosser *et al.*, 2015). Récemment, la technologie microfluidique a été utilisée pour former des constructions cellulaires en forme de fibre (Mazzitelli *et al.*, 2011). En effet, les techniques microfluidiques offrent la possibilité de contrôler le diamètre et les dimensions de ces fibres. Le principal avantage de ces systèmes réside dans le fait qu'ils peuvent reconstituer des fonctions cellulaires sans devoir construire l'organe entier *in vitro*. Ainsi, ces systèmes d'organes sur puce deviennent un complément à faible coût aux tests sur animaux pour la mise au point de nouveaux médicaments.

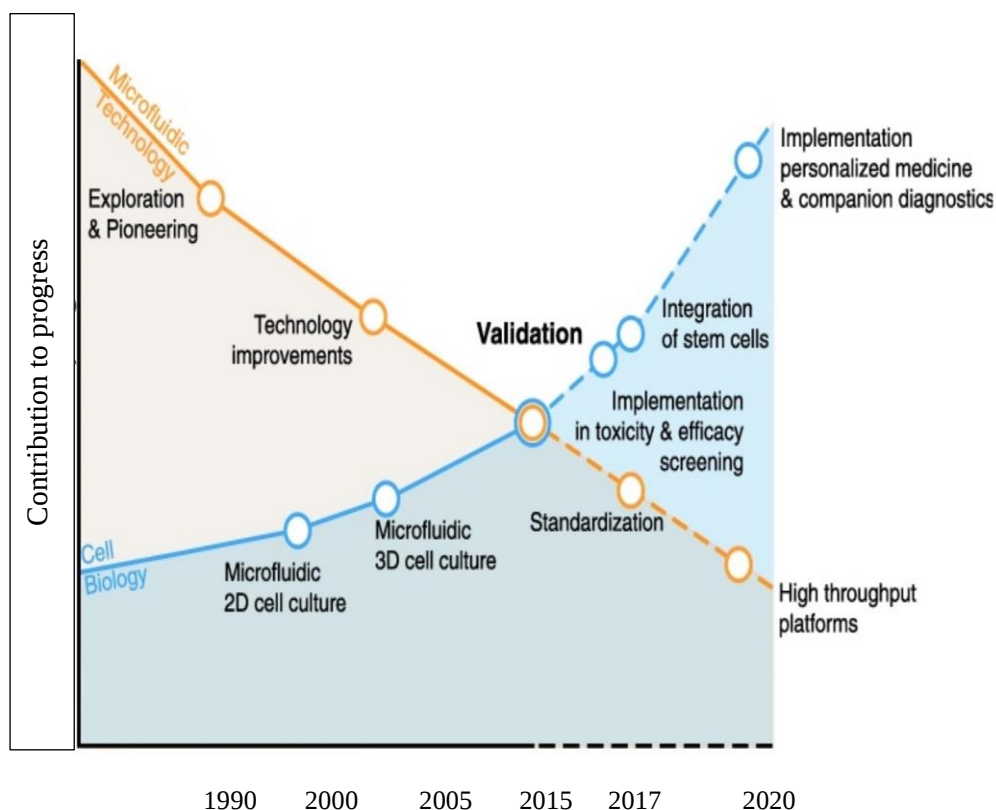


Figure V-3 Chronologie des développements révolutionnaires qui ont contribué à la mise en place de culture 3D sur dispositif microfluidique Depuis quelques années les outils microfluidiques sont en cours de validation. Après cette étape, les aspects de standardisation, et d'industrialisation de produits permettant le dépistage à haut débit vont se mettre en place. En parallèle, les progrès en biologie sont peu à peu intégrés dans ces nouvelles plateformes, notamment avec l'intégration des cellules souches qui permettent réellement d'envisager la mise au point de médicaments personnalisés (Van Duinen *et al.*, 2015).

6,2 Culture d'organoïdes en systèmes microfluidiques

En règle générale, la technique de culture d'organoïdes est faite dans des puits de culture en plastique ou en verre. Par exemple, des organoïdes ont permis de reconstruire la hiérarchie cellulaire de l'épithélium *in vivo* avec toutes les cellules de la lignée. Pour initier le modèle, des cryptes, des cellules souches ou des cellules pluripotentes sont isolées puisensemencées par la technique de la goutte suspendue (McClelland and Bowles, 2016) ou dans du Matrigel (matrice de membrane basale) et recouvertes d'un milieu de culture supplémenté par des facteurs de croissance nécessaires à la culture (Sato *et al.*, 2009).

Bien que cette culture offre une plateforme facile, elle ne permet pas de contrôler le flux de distribution des additifs supplémentés au milieu de culture (Chen *et al.*, 2011), ou la création de gradient chimique ou physique. En revanche, la technique microfluidique permet de maintenir une perfusion continue du milieu de culture et une ressemblance plus forte avec ce qui se passe *in vivo* (Rennert *et al.*, 2015). Les premières utilisations du Matrigel en microfluidique ont été réalisées dans le but d'incorporer des cellules dans une chambre de culture et d'y appliquer une perfusion de milieux de culture (Ng and Pun, 2008). La technique de perfusion en continu a pour but de mieux imiter les interactions cellule-cellule dans un microenvironnement semblable à celui des tissus *in vivo* (Toh *et al.*, 2007). Les dispositifs microfluidiques combinés avec la culture de gouttes suspendues (Frey *et al.*, 2014) et une culture dans des micropuits (Ota *et al.*, 2010) ont réussi à produire efficacement des sphéroïdes cellulaires de tailles uniformes. Plusieurs types d'organoïdes ont été développés dans des dispositifs microfluidiques notamment à partir du cœur (Giridharan *et al.*, 2010) de poumons (Tavana *et al.*, 2011) et de reins (Konar *et al.*, 2016). L'ensemble des cultures et des techniques sont représentées dans la figure V-4.

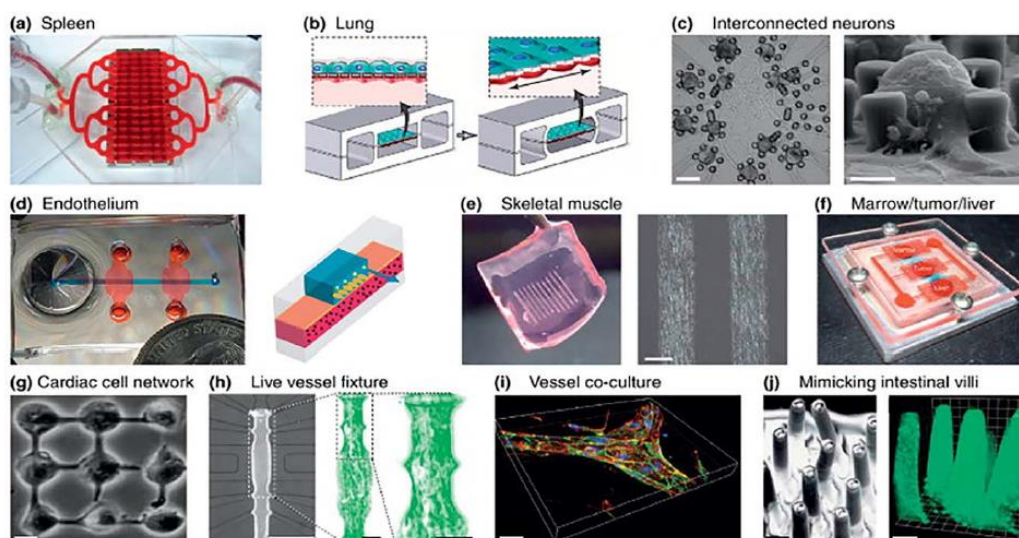


Figure V-4 Différents types de culture d'organes sur dispositif microfluidique. (a) rate, (b) poumons, (c) neurones connectées, (d) endothélium, (e) muscle strié squelettique (f) moelle osseuse/ tumeur/ foie, (g) réseaux de cellules cardiaques (h) dispositif de vaisseaux en temps réel (i) co-culture de vaisseaux (j) imitations de villosités intestinales (Gupta *et al.*, 2016)

Roberts *et al* (Roberts *et al.*, 2016) ont réussi à intégrer des capillaires artificiellement fabriqués dans une culture 3D (Figure V-5). Le but est de reconstituer le stimulus mécanique induit par le flux. Cette technique a permis de conclure que cette méthode a un intérêt certain dans la culture 3D et plus spécifiquement dans l'inhibition de l'hypoxie locale par une distribution homogène des gaz et des nutriments associée à l'élimination de facteurs toxiques. Il s'agit bien effectivement d'une avancée importante puisqu'un des problèmes majeurs de la culture 3D c'est l'optimisation de la circulation de façon à distribuer les nutriments et l'oxygène au sein du volume de la culture.

La microfluidique a aussi été utilisée pour étudier les interactions entre les cellules cancéreuses et leur microenvironnement. Par exemple, la perfusion en continu du milieu de culture a permis d'étudier les interactions cellulaires entre un mélange de cellules cancéreuses et des cellules stromales pulmonaires (Zervantonakis *et al.*, 2012). On parle dans ce cas de « Cancer sur puce » en écho au terme « Organe sur puce » qui rassemble l'ensemble des travaux visant à élaborer des modèles *in vitro* de nos organes (Zervantonakis *et al.*, 2012). Ces types de puce sont particulièrement bien adaptés à l'étude des signalisations cellulaires qui dépendent majoritairement de l'architecture tissulaire et des composants (chimiques ou physiques) du micro-environnement (Aziz *et al.*, 2017b). L'avenir de ces technologies se situe dans l'incorporation de cellules cancéreuses dérivées de patients pour des études biochimiques, biophysiques (Ahn *et al.*, 2017). Cette approche permettrait à terme de tester ou de développer des traitements directement ciblés pour agir sur le cancer d'un patient donné, conduisant la médecine vers des stratégies/protocoles thérapeutiques plus personnalisés.

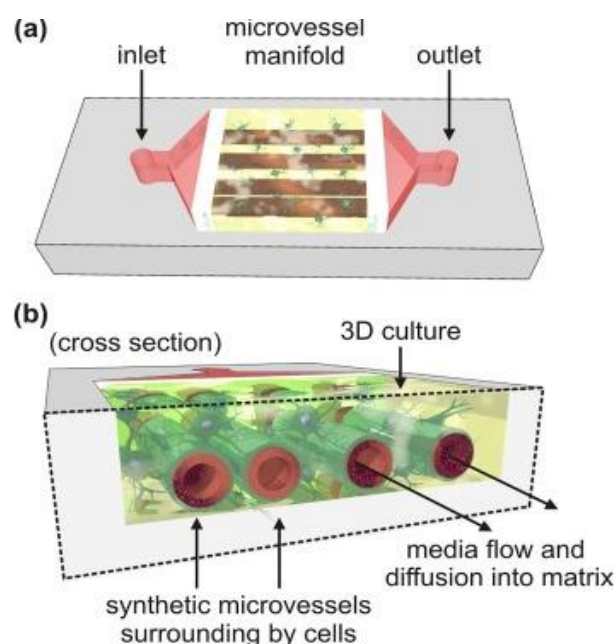


Figure V-5 Schéma d'un dispositif de culture d'organoïdes Le dispositif comporte un capillaire d'entrée et un autre de sortie permettant la distribution du milieu de culture. Ce capillaire est entouré par une chambre de culture (Gupta *et al.*, 2016).

6,3 Culture d'organes en systèmes microfluidiques

Par ailleurs, la microfluidique a aussi été associée à la culture d'explants (Hattersley *et al.*, 2011). Cette étude a permis de maintenir un explant de foie vivant pendant 4 jours. Un explant de la moelle épinière de souris a également été mis en culture dans un dispositif microfluidique afin d'explorer la communication entre muscle et neurone d'une part et la jonction neuromusculaire d'autre part (Ionescu *et al.*, 2016). L'étude de la migration de signal entre les neurones a été aussi examinée récemment sur des explants de cerveau d'embryon de souris (Nery *et al.*, 2015). Les auteurs ont mis en place deux puits de culture connectés par des microcanaux. Le signal a été observé et enregistré en temps réel en utilisant la microscopie. Cet exemple montre à quel point la microfluidique représente un outil puissant d'étude des phénomènes biologiques complexes en temps réel dans des environnements se rapprochant des caractéristiques fondamentales de l'*in vivo*. Une technique similaire a également été employée par Kim YongTae *et al.* (Kim *et al.*, 2011). Ces auteurs ont développé leur dispositif microfluidique de façon à étudier des réponses biologiques rapides telles que celles observées dans les processus de signalisation cellulaire et les réponses à long terme nécessaires pendant la formation des organes.

Plus récemment, la microfluidique a été utilisée pour mettre en culture un intestin de souris afin d'étudier le rôle du système nerveux dans l'interaction immunité – pathogène (Yissachar *et al.*, 2017). Il s'agit dans cet article du premier modèle de culture d'un tissu complet en utilisant la technique microfluidique (Figure V-6 et Figure V-7). L'intestin a été mis en culture pendant 24 heures. La notion de temps de culture est particulièrement intéressante pour nous. En effet, plus le temps de la culture est important, plus nous pourrions approfondir notre étude sur des phénomènes biologiques qui se déroulent avec des constantes de temps longues.

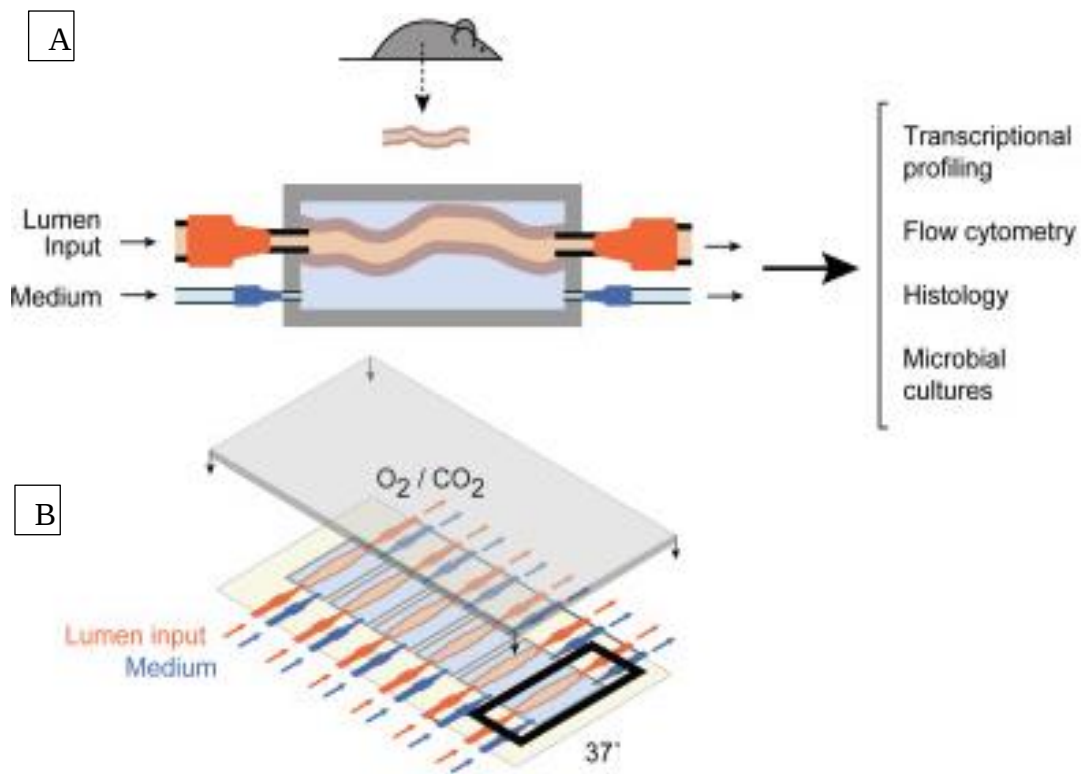


Figure V-6 Schémas du système de culture d'intestins de souris (A) L'intestin est relié à l'entrée et à la sortie de la chambre de culture et aux pompes contrôlant le flux de fluide à travers l'intestin. (B) L'ensemble du dispositif contient six chambres (Yissachar *et al.*, 2017)

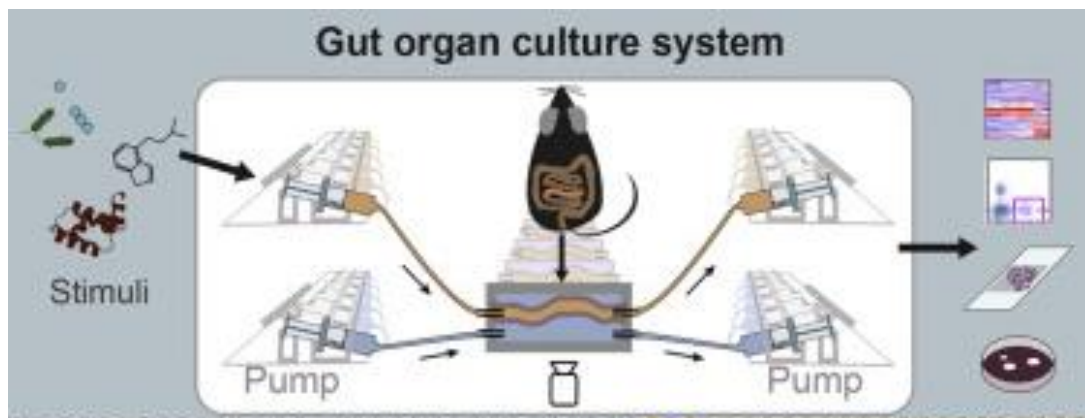


Figure V-7 Schéma d'ensemble du système de culture d'intestin de souris. 6 chambres de culture reliées chacune à deux pompes dont une est pour la distribution du milieu de culture et l'autre est utilisée pour la distribution des stimuli extérieurs. L'ensemble du dispositif est associé à un système d'imagerie permettant une observation en temps réel (Yissachar *et al.*, 2017)

En conclusion, toutes ces techniques offrent une opportunité d'approfondir notre connaissance de l'*in vivo*. Ces techniques vont sans doute être employées dans plusieurs domaines de recherche afin d'étudier le développement cellulaire, la physiologie mais aussi les maladies comme le cancer. Néanmoins, ces techniques doivent être sujettes à des améliorations pour bien élucider les interactions intercellulaires, les interactions entre les cellules et leur microenvironnement ou les interactions entre un hôte et un agent pathogène dans un contexte physiologique semblable à celui de l'*in vivo*.

VI. Objectifs, stratégies et résultats

Objectifs

Ce travail de thèse a été conçu dans le cadre d'un projet collaboratif mené entre l'Institut Pasteur de Lille (Centre d'infection et Immunité de Lille), l'Institut d'Électronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie et l'ISA-Lille Groupe YNCREA Hauts de France. L'objectif global est d'étudier la pathogénicité de *Cryptosporidium* et de développer un nouvel outil d'analyse basé sur une approche en trois dimensions *in vitro* pour l'étude de la cryptosporidiose et des mécanismes de cancérogenèse induits par le parasite.

Les objectifs spécifiques de cette thèse sont les suivants :

1. Etudier la pathogénicité de *Cryptosporidium* en mettant en évidence une association entre le développement de cancers coliques chez l'Homme et l'infection par le parasite.
2. Mettre au point un nouveau modèle de culture 3D de *Cryptosporidium* basé sur des explants entériques permettant la multiplication du parasite en continu tout en maintenant l'intégrité de la cellule hôte et de son environnement.
3. Développer et valider un dispositif microfluidique pour la culture d'explants entériques. Ce défi technologique, a l'ambition de concevoir un micro-système fluide qui permettra d'automatiser la culture d'explants entériques.

Stratégies

Dans le cadre de cette thèse, nous avons mis en place une méthodologie de travail qui est résumée ci-dessous :

- ✓ Le premier axe : L'étude du rôle de *Cryptosporidium* dans le développement de cancer digestif chez l'Homme se base sur les résultats précédemment obtenus par l'équipe montrant que *C. parvum* est capable d'induire un cancer digestif dans un modèle murin. Il semblait intéressant dans un premier temps de voir dans quelle mesure cela pouvait être transposable à

l'Homme. Une étude clinique a été mise en place au Liban, où les prévalences de *Cryptosporidium* au sein de plusieurs groupes de patients porteurs ou non de néoplasies digestives ont été étudiées et comparées.

- ✓ Le deuxième axe : Développement d'un modèle de culture 3D pour l'étude de la cryptosporidiose. Cet axe a pour but de répondre à un réel besoin de disposer d'un système de culture en continu du parasite pour mieux en étudier la pathogénicité et plus particulièrement sa capacité à induire des néoplasies digestives. Le modèle de culture 3D d'explants entériques est apparu être une solution si l'on réussissait à obtenir une multiplication en continu du parasite tout en maintenant l'intégrité de l'organe hôte et de son environnement. C'est pourquoi, le choix s'est porté tout d'abord sur l'utilisation d'intestins de souris SCID-D, que l'on sait très sensibles à l'infection par *Cryptosporidium*. Ces explants ont, pour commencer, été cultivés seuls puis avec *C. parvum*. Des approches moléculaires, immunohistochimiques et microscopiques ont été utilisées pour valider la culture de l'intestin d'une part et le maintien de l'infection par *Cryptosporidium* d'autre part.
- ✓ Le troisième axe : Développement d'une approche microfluidique pour la culture d'explant. Cet axe a proposé, quant à lui, le développement d'un dispositif microfluidique automatisé afin d'optimiser la culture d'explants. Ce volet a été réalisé en associant des approches d'ingénierie et de microfluidique au système de culture développé dans le premier axe du projet.

Résultats

Article 2 : Haute association entre l'infection par *Cryptosporidium* spp et le cancer colorectal chez des patients libanais

Titre: High association of *Cryptosporidium* spp. infection with colon adenocarcinoma in Lebanese patients

Préambule: Cet article a été accepté pour publications dans *PlosOne*

La cryptosporidiose est un problème majeur de santé publique. Cette maladie est due à un parasite protozoaire Apicomplexa, *Cryptosporidium* qui infecte un grand nombre de vertébrés y compris l'homme. Il entraîne des diarrhées autorésolutives chez les individus immucocompétents pouvant devenir chroniques voir léthales chez les individus immunodéprimés. Récemment une étude réalisée sur une cohorte de 22 500 enfants en Afrique sub-saharienne et en Asie, a montré que *Cryptosporidium* est l'un des quatre pathogènes responsables de diarrhées sévères et de mortalité due à des diarrhées chez les nourrissons et les jeunes enfants. De plus, l'équipe BDPEE a également mis en évidence que l'une des deux espèces qui infectent le plus souvent l'homme, *Cryptosporidium parvum* était capable d'induire des adénocarcinomes digestifs invasifs dans un modèle murin immunodéprimé. Bien qu'un certain nombre d'études épidémiologiques tendent à montrer une association entre la cryptosporidiose humaine et la pathologie cancéreuse, d'autres arguments en faveur de ce lien sont encore nécessaires. C'est pourquoi nous avons conçu cette nouvelle étude réalisée au Liban qui a eu pour objectif de déterminer la prévalence de *Cryptosporidium* et d'en identifier les espèces, dans une population de patients atteints ou non de cancers digestifs.

218 biopsies ont été obtenues auprès de deux laboratoires d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques de Tripoli, Liban. Ces échantillons ont été prélevés à partir de trois groupes de patients : (i) patients atteints de néoplasies ou adénocarcinomes coliques de diagnostic récent et avant tout traitement (n=72) (ii) patients atteints de néoplasies ou adénocarcinomes gastriques de diagnostic récent et avant tout traitement (n=21) (iii) patients non atteints de néoplasies ou d'adénocarcinomes digestifs mais présentant des symptômes digestifs persistants (n=125). L'ADN a été extrait à partir de copeaux de biopsies incluses en paraffine à l'aide du kit QIAamp DNA Mini kit (Qiagen®). L'identification de *Cryptosporidium* a été réalisée par PCR en temps réel ciblant le gène de l'ARNr 18S. Les produits de PCR où *Cryptosporidium* a été identifié ont été purifiés puis séquencés pour

déterminer les espèces de *Cryptosporidium*. Une analyse histologique ainsi qu'un marquage en immunofluorescence ont également permis de confirmer la présence du parasite dans les tissus.

Les résultats les plus marquants de cette étude sont :

- 1 La prévalence du parasite du groupe (i) qui est de 21% (15/72) a été comparée à celle de :
 - Patients des groupes (ii) et (iii) (n=146), patients avec néoplasies ou adénocarcinomes gastriques ou sans néoplasies mais avec des symptômes digestifs persistants, pour lesquels la prévalence a été de 7% (9/146). Le risque d'infections à *Cryptosporidium* est donc 4 fois plus important dans le groupe (i) (OR: 4, CI: 1.65-9.6, P=0.001).
 - Patients du group (iii) sans néoplasies coliques ou gastriques mais avec d'autres pathologies (diverticulite, polypes, inflammation...) (n=82). La prévalence est de 5/82). Il y a donc également 4 fois plus de risques d'infections à *Cryptosporidium* dans le groupe (i) que dans ce groupe (OR: 4.05, CI: 1.39-11.79, P=0.006).
 - Patients du groupe (iii) présentant des biopsies normales (n=44), la prévalence est d'environ 2% (1/44). Le risque d'infection est cette fois 11 fois plus important dans le groupe (i) (OR: 11.315, CI: 1.44-89.02, P=0.003).
 - Patients du groupe (ii), patients présentant des néoplasies ou adénocarcinome gastriques, la prévalence est nulle (0/15). La différence est statistiquement significative (P=0.014).
- 2 Après génotypage, deux espèces de *Cryptosporidium* spp ont été identifiées : 19 (79,2%) échantillons correspondant à *C. hominis*, et 5 (20,8%) correspondant à *C. parvum*. Si l'on considère seulement les néoplasies intraépithélial/adénocarcinome coliques, cette proportion est maintenue: 7 (78%) échantillons correspondant à *C. hominis* et 2 (22%) échantillons correspondant *C. parvum*.
- 3 La présence du parasite a été confirmée dans 11 des 15 biopsies coliques observées au microscope.

En conclusion, ces données offrent de nouveaux arguments en faveur d'un lien entre l'infection à *Cryptosporidium* et le développement d'adénocarcinomes coliques. De plus, *C. hominis* a pour la première fois été associé au développement de cancers. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour prouver que le parasite est bien à l'origine du développement de cancers coliques chez l'homme.

Ma contribution dans cette étude a été la suivante:

- Réalisation de certaines expériences
- Analyse des dernières données
- Rédaction de l'article

High association of *Cryptosporidium* spp. infection with colon adenocarcinoma in Lebanese patients

Short title: *Cryptosporidium* infection and colon cancer

Marwan Osman^{1,2}, Sadia Benamrouz^{1,3}, Karine Guyot¹, Martha Baydoun^{1,4,5}, Emilie Frealle^{1,6}, Magali Chabe^{1,7}, Nausicaa Gantois¹, Baptiste Delaire⁸, Anne Goffard⁹, Albert Aoun¹⁰, Nawaf Jurdi¹⁰, Fouad Dabboussi², Gael Even¹¹, Christian Slomianny¹², Pierre Gosset⁸, Monzer Hamze², Colette Creusy⁸, Eric Viscogliosi¹, Gabriela Certad^{1, 13 *}

¹ Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), UMR CNRS 8204, INSERM U1019, Université de Lille, CHU de Lille, Biologie et Diversité des Pathogènes Eucaryotes Emergents (BDPEE), Lille, France

² Laboratoire Microbiologie Santé et Environnement (LMSE), Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie, Faculté de Santé Publique, Université Libanaise, Tripoli, Lebanon.

³ Ecologie et Biodiversité, Faculté de Gestion, Economie et Sciences (FGES), Université Catholique de Lille, France

⁴ Univ. Lille, CNRS, ISEN, UMR 8520 - IEMN, Lille, France

⁵ ISA-YNCREA Hauts de France, Lille, France

⁶ Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille & Faculté de Médecine de Lille, Université Lille Nord de France, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre de Biologie et Pathologie, Lille, France

⁷ Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, Université Lille Nord de France, Département de Parasitologie–Mycologie, Lille, France,

⁸ Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Groupement des Hôpitaux de l'Université Catholique de Lille

⁹ Molecular and Cellular Virology, University Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019-UMR 8204-CIIL-Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Lille, France

¹⁰ Pathology Department, Faculty of Medicine, American University of Beirut, Lebanon

¹¹ Genes Difussion, Douai, France-PEGASE-Biosciences, Lille, France

¹² Laboratory of Cell Physiology, INSERM U 1003, Université de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

¹³ Département de la Recherche Médicale, Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille, Faculté de Médecine et Maïeutique, Université Catholique de Lille, France

* Gabriela Certad, gabriela.certad@pasteur-lille.fr

Abstract

Background: The association between *Cryptosporidium* and human colon cancer has been reported in different populations. However, this association has not been well studied. In order to add new strong arguments for a probable link between cryptosporidiosis and colon human cancer, the aim of this study was to determine prevalence and to identify species of *Cryptosporidium* among Lebanese patients. **Methodology and Principal Findings:** Overall, 218 digestive biopsies were collected in

Tripoli, Lebanon, from three groups of patients: (i) patients with recently diagnosed colon intraepithelial neoplasia/adenocarcinoma before any treatment (n=72); (ii) patients with recently diagnosed stomach intraepithelial neoplasia/adenocarcinoma before any treatment (n=21); and (iii) patients without digestive intraepithelial neoplasia/adenocarcinoma but with persistent digestive symptoms (n=125). DNA extraction was performed from paraffin-embedded tissue. The presence of the parasite in tissues was confirmed by PCR, microscopic observation and immunofluorescence analysis. We identified a high rate (21%) of *Cryptosporidium* presence in biopsies from Lebanese patients with recently diagnosed colonic neoplasia/adenocarcinoma before any treatment. This prevalence was significantly higher compared to 7% of *Cryptosporidium* prevalence among patients without colon neoplasia but with persistent gastrointestinal symptoms (OR: 4, CI: 1.65-9.6, $P=0.001$). When the comparison was done against normal biopsies, the risk of infection increased 11-fold in the group of patients with colon adenocarcinoma (OR: 11.315, CI: 1.44-89.02, $P=0.003$). **Conclusions:** This is the first study performed in Lebanon reporting the prevalence of *Cryptosporidium* among patients with digestive cancer. These results show that *Cryptosporidium* is strongly associated with human colon cancer being maybe a potential etiological agent of this disease.

Introduction

The protozoan *Cryptosporidium* constitutes a significant risk to humans and animals causing self-limiting diarrhea in immunocompetent hosts and life-threatening disease in immunocompromised hosts. Recently, a cohort study involving 22,500 children living in Africa and Asia revealed that *Cryptosporidium* represents one of the four pathogens responsible for severe diarrhea and mortality in infants and toddlers [1,2]. Additionally, our team has discovered that *Cryptosporidium parvum*, a species frequently isolated from humans and animals, is able to induce digestive adenocarcinoma in a rodent model, being the first time that an eukaryotic microorganism has been associated with neoplastic changes in the digestive epithelium of a mammalian host [3–6]. Consistently, some epidemiological studies have reported an association with cryptosporidiosis in patients with colorectal adenocarcinoma [7–9]. However, the correlation between cryptosporidiosis and human digestive cancer remains unclear at this time, and it is not known whether this intracellular parasite, considered an opportunistic agent, is able to induce gastrointestinal malignancies in humans. Therefore, these experimental and clinical observations represent a strong recommendation for

further clinical research into the causal involvement of *Cryptosporidium* spp. in human digestive cancer. In order to add new arguments for a probable association between cryptosporidiosis and digestive human cancer, the main aim of this study was to determine prevalence and to identify species of *Cryptosporidium* among a Lebanese digestive cancer population. Interestingly, a high rate (21%) of *Cryptosporidium* presence was found in biopsies from Lebanese patients with recently diagnosed colonic neoplasia/adenocarcinoma before any treatment. These results provide new data about a potential role of this parasite in the development of colon adenocarcinoma. However, further studies are needed to reach definitive conclusions about this association.

Materials and Methods

Ethics Statement

This study was approved from the Lebanese Minister of Public Health (reference number: 4-39716). In accordance with the ethical standards of the Lebanese legislation physicians within the common clinical practice orally informed all adult patients about potential utilization of biopsies for research or secondary purpose, and participants manifested verbally their non-opposition. To obtain written consent was not possible due to the fact that this study was retrospective. However, attestation statements signed by the physicians recording the verbal non-opposition manifested by participants were obtained. Data were analysed anonymously.

Study Population and Sample Collection

Digestive biopsies fixed in formalin and embedded in paraffin were collected in Tripoli, Lebanon, between 2012 and 2013 from three groups of patients: (i) patients with recently diagnosed colon intraepithelial neoplasia/adenocarcinoma before any treatment (n=72); (ii) patients with recently diagnosed stomach intraepithelial neoplasia/adenocarcinoma before any treatment (n=21); and (iii) patients without colon or stomach intraepithelial neoplasia/adenocarcinoma but with persistent digestive symptoms that justified biopsy sampling (n=125). For the purpose of statistical analysis the experimental group (i) was compared to different subgroups: a) all patients of groups (ii) and (iii) (n=146). b) patients of group (iii) without colonic neoplasia but with other colonic pathology such as diverticulitis, colitis, polyps, inflammatory disease, etc. (n=72); c) patients of group (iii) with a normal digestive biopsy (n=44). In this group only patients without evidence of histological alterations were included. Finally group (i) was also compared to group (ii). The sample size

corresponds to the number of samples that we could collect during a specific period due to logistic reasons. All patients were negative for human immunodeficiency virus.

DNA extraction

Paraffined sections were treated with xylene and ethanol and then rehydrated. To disrupt the wall of potential oocysts, the samples were lysed using glass beads (Sigma Aldrich, Germany). DNA was extracted from 2 sections of 30 µm from each block using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). The extracted DNA was quantified by a spectrophotometer by Nanodrop. In order to test fragmentation, 10 µl of DNA samples randomly selected were electrophoresed on a 1% agarose gel containing 0.5 µg/ml ethidium bromide. The gel was run at a low voltage and DNA ladders were finally visualized by a UV light. To avoid the risk of cross-contaminations between two consecutive paraffin blocks histological standard procedures for cleaning workspace and instruments were applied.

real-time PCR for *Cryptosporidium* spp. detection

The 18S rRNA real-time PCR was performed as previously described [10]. Positive PCR products were purified and sequenced by Genoscreen (Pasteur Institute, Lille, France). The sequences obtained were aligned using the BioEdit v7.0.1 package, and then compared with sequences of *Cryptosporidium* published in the NCBI. To avoid contamination of the histological samples standard procedures for cleaning workspace and instruments were applied including extensive microtome washing with DNA decontamination solution with each new sample section.

Histological examination

Cryptosporidium was detected in histological sections after hematoxylin-eosin staining and immunofluorescence using a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-*Cryptosporidium* spp. monoclonal antibody (Cellabs, Brookvale, New South Wales, Australia).

Epstein-Barr virus detection

Genomic detection and quantification of Epstein-Barr virus (EBV) was performed from 10 µl of DNA using the quantitative EBV R-gene test system (Argene, BioMérieux Marcy l'Etoile, France).

Statistical analysis

For the statistical analysis, Fisher's exact test was used to test the relationship between different categorical variables. Odds ratios were calculated with *Cryptosporidium* infection as the main outcome using a logistic regression model.

A multivariate binary logistic regression analysis was used to test statistical relationship between *Cryptosporidium* infection and colon intraepithelial neoplasia/adenocarcinoma status taking in account confounding effect such as patient age, sex and affected organs. The general significance level was set at a *P*-value below 0.05. All analyses were performed using Vassarstats software and packages stats from the R statistical computing program [11].

RESULTS

A total of 218 biopsies were collected in this study. The age of the patients was between 18 and 92 years (mean age: 50 ± 19). No significant differences related to age or sex were observed between groups. However, in patients with *Cryptosporidium* infection and colon neoplasia, the median age at time of diagnosis was lower compared to those patients with colon neoplasia without infection ($X = 57,7$ vs. $X = 60,19$). Additionally, the age distribution in these two groups differed considerably (Fig. 1): for the second group, the age range was wider when compared to the first one, even if this difference was not significant. A possible explanation would be that the group control may include those persons with hereditary factors that predispose to get colon cancer before 30s but unfortunately, this kind of information was not available.

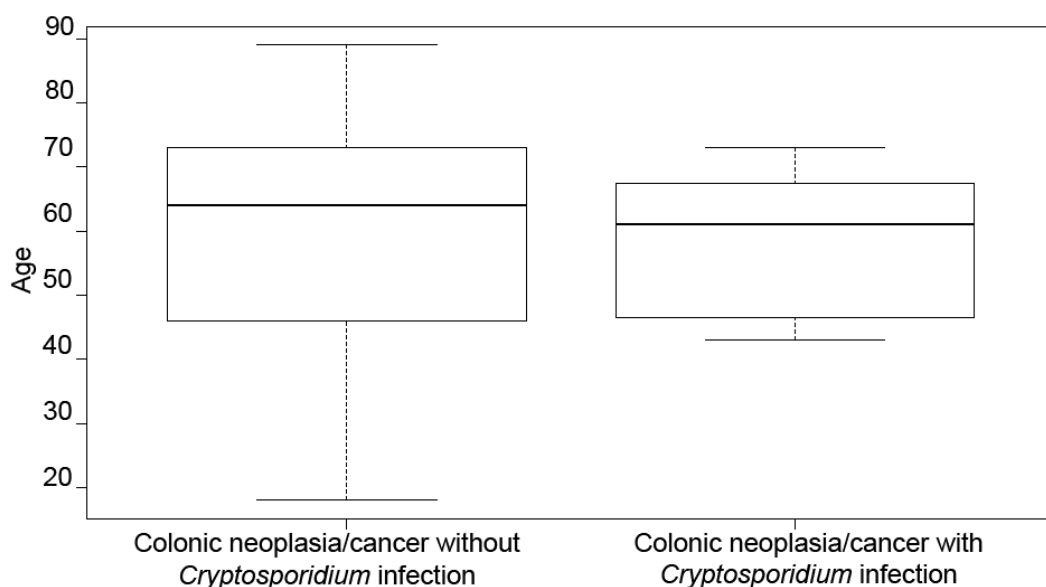


Fig. 1 caption

Age distribution among groups of patients with colonic neoplasia, infected or not by *Cryptosporidium*. Each box represents half of the data between upper and lower quartile, the black line being the median.

After DNA quantitation and quality assessment, using qPCR, *Cryptosporidium* infection was detected in 21% (15/72) of patients with recently diagnosed colon intraepithelial neoplasia/adenocarcinoma compared to 7% (9/146) of patients without digestive neoplasia but with persistent gastrointestinal symptoms, where the risk of *Cryptosporidium* infection was thus 4 times higher in the first group (OR: 4, CI: 1.65-9.6, $P=0.001$). Similarly, when considering only colon disease, patients with colon intraepithelial neoplasia/adenocarcinoma also had a 4 times higher risk of *Cryptosporidium* infection than patients without neoplasia but with other colon pathologies (OR: 4.05, CI: 1.39-11.79, $P=0.006$). When the comparison was done using normal biopsies, the risk of infection increased 11-fold in the group of patients with colon adenocarcinoma (OR: 11.315, CI: 1.44-89.02, $P=0.003$). *Cryptosporidium* infection was found only in colonic but not in gastric neoplasia samples, and this difference was significant ($P=0.014$) (Table 1).

Table 1. Frequency of *Cryptosporidium* infection in biopsies from patients with colonic intraepithelial neoplasia/adenocarcinoma compared to control groups

Groups () and Subgroups []	Presence of <i>Cryptosporidium</i> N (%)	Absence of <i>Cryptosporidium</i> N (%)	OR	95% CI	P
Colonic intraepithelial neoplasia/adenocarcinoma (i)	15/72 (20.83)	57/72 (79.16)	4.006	(1.65-9.679)	0.0016
Other digestive pathologies [a]	9/146 (6.16)	137/146 (93.83)			
Colonic intraepithelial neoplasia/adenocarcinoma (i)	15/72 (20.83)	57/72 (79.16)	4.05	(1.39-11.79)	0.0062
Other colonic pathologies (without intraepithelial neoplasia/adenocarcinoma) [b]	5/82 (6.09)	77/82 (93.90)			
Colonic intraepithelial neoplasia/adenocarcinoma (i)	15/72 (20.83)	57/72 (79.16)	11.315	(1.44-89.02)	0.0031
Normal digestive biopsies [c]	1/44 (2.27)	43/44 (97.72)			

Colonic	15/72 (20.83)	57/72 (79.16)	NA	NA	0.01
intraepithelial neoplasia/adenocarcinoma					
(i)					
Gastric intraepithelial neoplasia/adenocarcinoma	0/21 (0)	21/21(100)			
(ii)					

NA/Not applicable

(i) patients with recently diagnosed colon intraepithelial neoplasia/adenocarcinoma before any treatment (n=72); (ii) patients with recently diagnosed stomach intraepithelial neoplasia/adenocarcinoma before any treatment (n=21); and (iii) patients without colon or stomach intraepithelial neoplasia/adenocarcinoma but with persistent digestive symptoms that justified biopsy sampling (n=125). For the purpose of statistical analysis the experimental group (i) was compared to different subgroups: a) all patients of groups (ii) and (iii) (n=146). b) patients of group (iii) without colonic neoplasia but with other colonic pathology such as diverticulitis, colitis, polyps, inflammatory disease, etc. (n=72); c) patients of group (iii) with a normal digestive biopsy (n=44). In this group only patients without evidence of histological alterations were included. Finally group (i) was also compared to group (ii).

Additionally, we checked that positive cases did not involve consecutive samples and the presence of the parasite in tissues was verified by microscopic observation.

The multivariate binary logistic regression analysis showed that the variable colonic neoplasia/cancer continued to be significantly associated to *Cryptosporidium* infection after adjusting by age, sex or affected organ (Table 2). Inflammation was not significantly associated with the presence of the parasite ($P=0.3$). After genotyping *Cryptosporidium* positive cases, two *Cryptosporidium* species were found: 19 (79.2%) samples were identified as *C. hominis*, while 5 (20.8%) were identified as *C. parvum*. When only colon intraepithelial neoplasia/adenocarcinoma was considered, this proportion was maintained: the presence of 7 (78%) *C. hominis* and 2 (22%) *C. parvum* isolates was confirmed. The sequences obtained showed 100% identity with GenBank reference sequences. There were not differences in the risk for colon cancer when these species were considered independently. The presence of the parasites in tissues was confirmed by microscopic observation in 11 colonic neoplastic sections out of 15 (Fig. 2).

Table 2. Multivariate binary logistic regression analysis of the association between *Cryptosporidium* infection and colonic neoplasia/cancer development, age, sex or affected organ

Variables	Estimate	Std. Error	Z value	P-value
Colonic neoplasia/ cancer	1.06350	0.50478	2.107	0.0351*
Age	-0.01439	0.01307	-1.101	0.2709
Sex	-0.00817	0.45139	-0.018	0.9856
Affected organ	-0.67756	0.58021	-1.168	0.2429

* Significant P-value

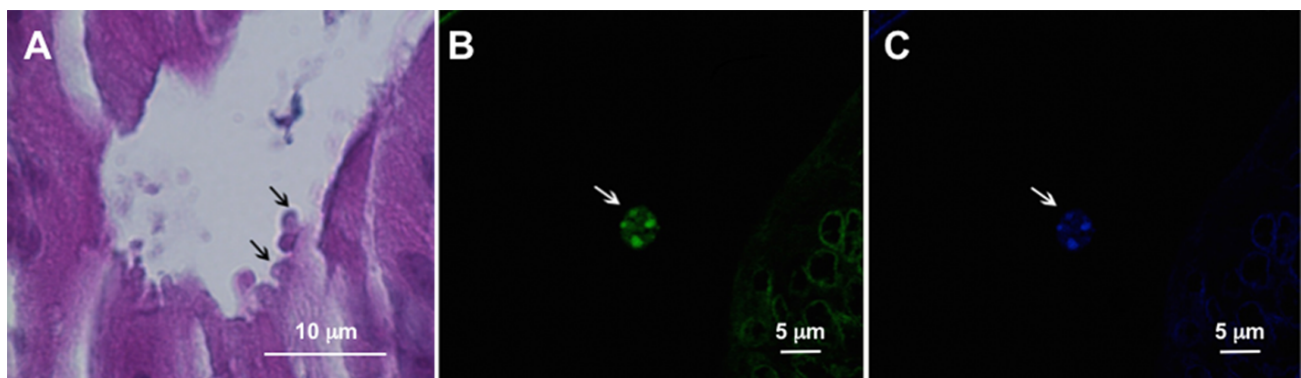


Fig. 2 caption

Histological sections from a colon adenocarcinoma associated to *Cryptosporidium* infection. (A) *Cryptosporidium* developmental stages were observed in the apical position (arrows) within the epithelial cells of the intestinal glands (hematoxylin and eosin). (B) A *Cryptosporidium* oocyst is shown (arrow) in the lumen of an intestinal gland after immunofluorescence (fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-*Cryptosporidium* spp. MAbs.) (C) Four sporozoites in the oocyst were observed (arrow) (staining with 4,6-diamidino 2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)).

In order to exclude EBV, an oncogenic pathogen potentially responsible for colon cancer, biopsies from cancerous and control subjects were analyzed. Results showed a homogeneous distribution of the virus among groups of *Cryptosporidium*-infected and non-infected patients, as well as among subjects with and without colon cancer.

DISCUSSION

The data herein indicates that *Cryptosporidium* was highly prevalent among Lebanese patients with colon intraepithelial neoplasia/adenocarcinoma, and this prevalence was significantly higher compared with the burden of cryptosporidiosis in control groups.

This prevalence of *Cryptosporidium* detected in these patients is also higher compared with prevalence reported in previous Lebanese epidemiological studies: 10% in *Cryptosporidium*-symptomatic patients and schoolchildren, and 5% detected in the general population [12,13], while the prevalence in the control group was in the range previously reported in the general Lebanese population [12].

Our results also showed a homogeneous distribution of other potential oncogenic pathogen, such as EBV [14] among groups, consistent with the fact that this virus infects almost everyone in early life and persists throughout life.

On the other hand, the molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates allowed the identification of either *C. hominis* or *C. parvum*, with the former being predominant (79%). These results confirm recent reports in Lebanon showing the presence of these two species with the predominance of *C. hominis* [12]. Furthermore, for the first time, *C. hominis* has been associated with colon adenocarcinoma.

Because *Cryptosporidium* is an opportunistic agent that causes significant morbidity and mortality in immunocompromised patients, it is possible that individuals with malignancies, have a higher risk of developing infection with this parasite, especially when their immunosuppression is more severe. In this study, samples originated from recently diagnosed HIV negative patients, and before any treatment to avoid the decline in CD4+ and CD8+ T-cell counts. Then, the risk of an opportunistic infection due to the presence of cancer as immunodebilitating condition seemed to be low. However, one of the limitations of this study was the lack of information concerning the CD4+ and CD8+ counts of these patients. Further studies should be done taking into account this variable.

Associations between *Cryptosporidium* infection and digestive neoplasia in different populations have been described. A recent study conveyed that the risk of developing a colon carcinoma is significantly elevated among AIDS patients presenting cryptosporidiosis [9]. A possible association

between human cryptosporidiosis and bile-duct carcinoma was suggested in children with X-linked hyper-IgM syndrome [15].

Furthermore, epidemiological studies in Poland reported a frequency of 18% and 12.6% of cryptosporidiosis in patients with recently diagnosed colorectal cancer before any immunosuppressive treatment, but in these studies the species responsible for infection were not determined [7, 8].

In fact, the potential role of *Cryptosporidium* in the development of neoplasia would not be surprising, considering that epidemiological and clinical reports indicate that eukaryotic protozoan, such as intracellular apicomplexan that cause diseases of medical or economic importance, can be linked to various cancers, for instance: *Theileria* induce host cell transformation while *Plasmodium* was linked epidemiologically to the "African lymphoma belt" over fifty years ago [16]. These intracellular eukaryotic parasites hijack cellular pathways to manipulate the host cell epigenome, cellular machinery, signaling pathways and epigenetic programs and marks, such as methylation and acetylation, for their own benefit [16].

Particularly, it has been reported that *C. parvum* for its survival and transmission interferes with host signaling pathways [17, 18]. For instance, in an *in vitro* model of biliary cryptosporidiosis *C. parvum* was shown to activate the NF- κ B pathway in infected cells, preventing the induction of apoptosis after infection [19]. Interestingly, NF- κ B family of transcription factors regulates the activation of several intracellular survival signals including the c-Myc protooncogene. Indeed, activation of NF- κ B has been observed in many cancers, including colon cancer [20]. However, it has been found in *in vitro* studies that *C. parvum*, can modulate host-cell apoptosis, inhibiting apoptosis at the trophozoite stage and promoting this process at the sporozoite and merozoite stages [21]. Modulation of apoptotic pathways was also investigated by microarray analysis in an *in vitro* model using human ileocaecal HCT8 cells. Genome wide expression profiling revealed high proportion of apoptosis genes regulated during *C. parvum* infection [22]. In fact, resistance to apoptosis could be a crucial step in the progression to malignancy [17].

Moreover, it is well known that the parasite induces modifications of the host actin cytoskeleton of intestinal epithelial cells although little information is available about the significance of the host actin remodelling process. Several studies reported that infection of intestinal and biliary epithelial cells requires host cell actin polymerization and cytoskeleton remodelling [18]. This polymerization uses the actin branching and nucleation machinery of the Arp2/3 complex of proteins. Several signaling axes such as those of PI3-kinase, guanine exchange factor, Frabin-dependent activation of the small GTPase, and CDC42- and c-Src-dependent activation of cortactin have been identified to

modulate actin reorganization and *Cryptosporidium* internalization [18]. In consistence, recently it was found that *C. parvum*, independently of the strain, is able to modulate host cytoskeleton activities and several host-cell biological processes via the Wnt signaling pathway in SCID mice [23].

CONCLUSIONS

This is the first study performed in Lebanon reporting the prevalence of *Cryptosporidium* among patients with digestive cancer. These results show that *Cryptosporidium* is strongly associated with human colon cancer providing new data about a potential role of this parasite in the development of colon adenocarcinoma. However, further studies are needed to reach definitive conclusions about this association. The last but not least, changes in bowel habits, including diarrhea, have been found as significant predictors of colorectal cancer. Maybe presence of *Cryptosporidium* infection could be one of the causes explaining these symptoms.

Research into this topic would be worthwhile, since the incidence of *Cryptosporidium* infection seems to be increasing worldwide [1,2,13,24]. In addition, the World Health Organization acknowledges that nowadays 20% of cancers are due to infectious agents, and some authors have hypothesized that within 2050 the great majority of cancers will be considered to have an infectious origin [25].

Acknowledgments

We would like to thank Nigel J. Clifford for the critical review of the manuscript.

References

- [1] Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*. 2013;382: 209-222.
- [2] Striepen B. Time to tackle cryptosporidiosis. *Nature*. 2013;503:189–191.
- [3] Certad G, Ngouanesavanh T, Guyot K, Gantois N, Chassat T, Mouray A et al. *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma. *Infect Agent Cancer*. 2007;2:22.
- [4] Certad G, Creusy C, Ngouanesavanh T, Guyot K, Gantois N, Mouray A et al. Development of *Cryptosporidium parvum*-induced gastrointestinal neoplasia in severe combined immunodeficiency (SCID) mice: severity of lesions is correlated with infection intensity. *Am*

J Trop Med Hyg. 2010;82:257–265.

- [5] Certad G, Benamrouz S, Guyot K, Mouray A, Chassat T, Flament N et al. Fulminant cryptosporidiosis after near-drowning: a human *Cryptosporidium parvum* strain implicated in invasive gastrointestinal adenocarcinoma and cholangiocarcinoma in an experimental model. Appl Environ Microbiol. 2012;78:1746–1751.
- [6] Benamrouz S, Guyot K, Gazzola S, Mouray A, Chassat T, Delaire B et al. *Cryptosporidium parvum* infection in SCID mice infected with only one oocyst: qPCR assessment of parasite replication in tissues and development of digestive cancer. PLoS One. 2012; 7:e51232.
- [7] Sulzyc-Bielicka V, Kuźna-Grygiel W, Kołodziejczyk L, Bielicki D, Kładny J, Stepień-Korzonek M et al. Cryptosporidiosis in patients with colorectal cancer. J Parasitol. 2007; 93:722–724.
- [8] Sulzyc-Bielicka V, Kołodziejczyk L, Jaczewska S, Bielicki D, Kładny J, Safranow K. Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in patients with colorectal cancer. Pol Przegl Chir. 2012; 84:348–351.
- [9] Shebl FM, Engels EA, Goedert JJ. Opportunistic intestinal infections and risk of colorectal cancer among people with AIDS. AIDS Res Hum Retroviruses. 2012;28:994–999.
- [10] Mary C, Chapey E, Dutoit E, Guyot K, Hasseine L, Jeddi F et al. Multicentric evaluation of a new real-time PCR assay for quantification of *Cryptosporidium* spp. and identification of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. J Clin Microbiol. 2013;51:2556–2563.
- [11] R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing | GBIF.ORG. R Found Stat Comput Vienna, Austria 2011:ISBN 3–900051 – 07–0, URL <http://www.R-project.org>.
- [12] Osman M, El Safadi D, Benamrouz S, Guyot K, Dei-Cas E, Aliouat el M et al. Initial data on the molecular epidemiology of cryptosporidiosis in Lebanon. PLoS One. 2015;10: e0125129.
- [13] Osman M, El Safadi D, Cian A, Benamrouz S, Nourrisson C, Poirier P et al. Prevalence and Risk Factors for Intestinal Protozoan Infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among Schoolchildren in Tripoli, Lebanon. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10:e0004496.
- [14] Fiorina L, Ricotti M, Vanoli A, Luinetti O, Dallera E, Riboni R et al. Systematic analysis of human oncogenic viruses in colon cancer revealed EBV latency in lymphoid infiltrates. Infect Agent Cancer; 2014;9:18.
- [15] Leven EA, Maffucci P, Ochs HD, Scholl PR, Buckley RH, Fuleihan RL et al. Hyper IgM Syndrome: a Report from the USIDNET Registry. J Clin Immunol. 2016;36:490–501.
- [16] Cheeseman K, Certad G, Weitzman JB. Parasites and cancer: is there a causal link?. Med Sci (Paris). 2016;32:867–73.
- [17] Benamrouz S, Conseil V, Creusy C, Calderon E, Dei-Cas E, Certad G. Parasites and malignancies, a review, with emphasis on digestive cancer induced by *Cryptosporidium parvum* (Alveolata: Apicomplexa). Parasite. 2012;19:101–15.

- [18] Certad G, Viscogliosi E, Chabé M, Cacciò SM. Pathogenic mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. Trends Parasitol. 2017;S1471-4922(17)30064-8. doi: 10.1016/j.pt.2017.02.006
- [19] Chen XM, Levine SA, Splinter PL, Tietz PS, Ganong AL, Jobin C, Gores GJ et al. *Cryptosporidium parvum* activates nuclear factor kappaB in biliary epithelia preventing epithelial cell apoptosis. Gastroenterology. 2001;120:1774–83.
- [20] Viennois E, Chen F, Merlin D. NF-κB pathway in colitis-associated cancers. Transl Gastrointest Cancer. 2013;2:21–29.
- [21] Mele R, Gomez Morales MA, Tosini F, Pozio E. *Cryptosporidium parvum* at different developmental stages modulates host cell apoptosis in vitro. Infect Immun. 2004; 72:6061–6067.
- [22] Liu J, Deng M, Lancto CA, Abrahamsen MS, Rutherford MS, Enomoto S. Biphasic Modulation of Apoptotic Pathways in *Cryptosporidium parvum*-Infected Human Intestinal Epithelial Cells. Infect Immun. 2009;77:837–849.
- [23] Benamrouz S, Conseil V, Chabé M, Praet M, Audebert C, Blervaque R, Guyot K et al. *Cryptosporidium parvum*-induced ileo-caecal adenocarcinoma and Wnt signaling in a mouse model. Dis Model Mech. 2014;7:693–700.
- [24] Sow SO, Muhsen K, Nasrin D, Blackwelder WC, Wu Y, Farag TH, Panchalingam S et al. The Burden of *Cryptosporidium* Diarrheal Disease among Children <24 Months of Age in Moderate/High Mortality Regions of Sub-Saharan Africa and South Asia, Utilizing Data from the Global Enteric Multicenter Study (GEMS). PLoS Negl Trop Dis. 2016; 10:e0004729.
- [25] Bañuls AL, Thomas F, Renaud F. Of parasites and men. Infect Genet Evol. 2013; 20:61–70.

Article 3 : Développement d'un système de culture 3D à partir d'explants entériques murins pour l'étude de la cryptosporidiose

Titre: Three-dimensional (3D) culture of adult murine colon as an *in vitro* model of cryptosporidiosis: Proof of concept

Préambule: Cet article a été accepté pour publication à Scientific Reports

Résumé: *Cryptosporidium parvum* est une cause importante de diarrhée et a récemment été associé au développement de cancers colorectaux digestifs. Malgré son impact sur la santé humaine, la pathogénicité de *Cryptosporidium* reste insuffisamment étudiée. Cela est dû principalement à l'absence d'une méthode de culture adéquate à long terme de ce parasite. En effet, malgré les importantes avancées techniques dans la culture de *Cryptosporidium*, la plupart de ces techniques se basent sur l'utilisation de cellules transformées ou de techniques empêchant l'étude de l'interaction hôte-parasite. D'autre part, le rôle du microenvironnement dans le comportement cellulaire devient un facteur important à prendre en considération dans les études *in vitro*. Il sera donc intéressant d'étudier l'interaction hôte-*Cryptosporidium* dans un environnement proche de l'*in vivo*.

Ainsi, le but de cette étude était de développer un modèle de culture tridimensionnelle (3D) à partir de côlon murin permettant l'étude des interactions hôte-parasite dans un environnement similaire à celui de l'*in vivo*. Des explants de colon de souris SCID-D ont été mise en culture. Au bout de huit jours, ces explants ont été infectés par *C. parvum*. Des approches histologiques et moléculaires ont été utilisées pour évaluer la viabilité du tissu et l'infection par *C. parvum*. Les principaux résultats sont les suivants :

- 1 Explant seul : La viabilité de l'explant a été validée pour une durée de 5 jours puisque l'architecture histologique du tissu et la prolifération cellulaire ont été maintenues.
- 2 Explant infecté par *C. parvum* a été confirmée. L'infection par *C. parvum* a été maintenue durant 27 jours. Des formes extracellulaires et intracellulaires du parasite ont été observées sur les coupes histologiques. De plus, une augmentation importante de la quantité génomique de l'ADN de *Cryptosporidium* a été mise en évidence dans le milieu de culture. Enfin, un marquage en immunofluorescence du milieu de culture a permis d'observer des oocystes 22 jours post-infection.
- 3 Le développement d'une néoplasie de bas grade a été mis en évidence au bout de 27 jours d'infection (35 jours de culture) dans les explants infectés par *C. parvum*. Ces néoplasies se caractérisent par : une diminution de l'espace interglandulaire, un épithélium chevauchant

présentant une perte de polarité nucléaire, avec une légère pseudostratification et des noyaux hyperchromatiques.

En conclusion, cette étude a montré pour la première fois, un explant maintenu vivant durant 35 jours et capable d'être infecté par *C. parvum* et l'infection a été maintenue durant au moins 27 jours. Plus encore, il s'agit du premier modèle 3D de développement de néoplasie après une infection parasitaire. Ce résultat apporte une validation supplémentaire du pouvoir oncogène de *Cryptosporidium*.

Ma contribution dans cette étude a été la suivante:

- Conception de l'étude
- Réalisation des expériences
- Analyse des données
- Rédaction de l'article

Three-dimensional (3D) culture of adult murine colon as an *in vitro* model of cryptosporidiosis: Proof of concept

Martha Baydoun^{1,2,3}, Sadia Benamrouz Vanneste^{1,4}, Colette Creusy⁵, Karine Guyot¹, Nausicaa Gantois¹, Magali Chabe^{1,6}, Baptiste Delaire⁵, Anthony Mouray⁷, Atallah Baydoun^{8,9,10}, Gerard Forzy¹¹, Vincent Chieux¹¹, Pierre Gosset^{1,5}, Vincent Senez³, Eric Viscogliosi¹, Jérôme Follet^{2,3}, Gabriela Certad^{1,12}

¹: Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR 8204 – CIIL – Centre d’Infection et d’Immunité de Lille, Lille, France ²: ISA-YNCREA Hauts de France, 48 Bd. Vauban, 59046 Lille Cedex, France. ³ Univ. Lille, CNRS, ISEN, UMR 8520 - IEMN, Lille F-59000, France. ⁴: Ecologie et biodiversité, Faculté Libre des Sciences et Technologies de Lille, Univ. Catholique de Lille, Univ. de Lille, France ⁵: Service d’Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Groupe Hospitalier de l’Université Catholique de Lille, France ⁶: Faculté de Pharmacie, Univ. de Lille, France ⁷: Plateforme d’Expérimentations et de Hautes Technologies Animales, Institut Pasteur de Lille, 59021 Lille, France ⁸: Department of Internal Medicine, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, OH, USA ⁹: Department of Internal Medicine, Louis Stokes VA Medical Center, Cleveland, OH, USA ¹⁰: Department of Biomedical Engineering, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA ¹¹: Laboratoire de Biologie médicale, Groupe hospitalier de l’Institut Catholique (GHICL), Lille, France ¹²: Faculté de Médecine et de Maïeutique, Univ. Catholique de Lille, Univ. de Lille, France.

Abstract

Cryptosporidium parvum is a major cause of diarrheal illness and was recently potentially associated with digestive carcinogenesis. Despite its impact on human health, *Cryptosporidium* pathogenesis remains poorly known, mainly due to the lack of a long-term culture method for this parasite. Thus, the aim of the present study was to develop a three-dimensional (3D) culture model from adult murine colon allowing biological investigations of the host-parasite interactions in an *in vivo*-like environment and, in particular, the development of parasite-induced neoplasia. Colonic explants were cultured and preserved *ex vivo* for 35 days and co-culturing was performed with *C. parvum*. Strikingly, the resulting system allowed the reproduction of neoplastic lesions *in vitro* at 27 days post-infection (PI), providing new evidence of the role of the parasite in the induction of carcinogenesis. This promising model could facilitate the study of host-pathogen interactions and the investigation of the process involved in *Cryptosporidium*-induced cell transformation.

Introduction

The *Cryptosporidium* spp. are Apicomplexan parasites of medical and veterinary importance. Currently, more than 25 *Cryptosporidium* species have been described, but the number of newly

named species is increasing continuously. Among these, some are considered to be host-specific, while others exhibit a larger host range, such as *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*)¹⁻³. *C. parvum* and *C. hominis* are responsible for most human cases of cryptosporidiosis, with severe diarrhea being the main clinical manifestation. Indeed, *Cryptosporidium* is considered the second cause of childhood diarrhea leading to infant mortality in Africa and Asia⁴. Unfortunately, this parasite remains one of the major causes of diarrheal disease for which no effective therapy is available⁵.

Furthermore, *C. parvum* has been associated with digestive carcinogenesis in different populations in humans. Epidemiological studies in Poland reported a frequency of 18% and 13% of cryptosporidiosis in patients with colorectal cancer⁶. A potential association between *Cryptosporidium* infection and bile-duct carcinoma was also suggested in children with X-linked hyper-IgM syndrome⁷. Another study reported that the risk of colon carcinoma is significantly elevated among AIDS patients presenting cryptosporidiosis. Consistent with a potential tumorigenic role of this parasite, the ability of *C. parvum* to induce gastrointestinal cancer has also been established in a rodent model⁸⁻¹¹. *C. parvum* was found to induce colic adenocarcinoma in SCID mice, even with very low doses of inoculum¹². Therefore, identifying a surrogate model for studying *C. parvum* pathology and induced carcinogenesis in an *in vitro* setting is extremely challenging.

While progress has been made in developing technologies for the study of *Cryptosporidium*, including the development of culture systems, animal models, and molecular genetic tools that allow the transfection of the parasite¹³, the understanding of *Cryptosporidium* pathogenesis remains problematic. Concerning efforts to develop *in vitro* models, the inability to propagate *Cryptosporidium* continuously *in vitro* has been a major obstacle to studying the cell invasion, immunological response or pathogenesis of this parasite. Most *in vitro* culture studies to date have been performed using cancer-derived epithelial cell lines and all still suffered from failure of long-term parasite spreading, low yields of oocysts and/or lack of reproducibility¹⁴. In particular, the most common *Cryptosporidium* culture system is based on the use of immortalized cell lines, such as HCT-8¹⁵. In fact, the HCT-8 cell line supports a higher rate of infection than alternative ones, without diminishing infectivity with cell age¹⁶. However, the two-dimensional (2D) cell culture models remain limited in the understanding of the microenvironment that contributes significantly to cell response. On the other hand, some studies have reported the development of *Cryptosporidium* in different cell-free culture systems¹⁷, with one major limitation in the ability to show internal ultrastructure of sexual development of the parasite. Only recently did a study confirm the gametogony and sporogony of *C. parvum* in cell-free cultures and describe their ultrastructure as well¹⁸. However, due to the absence of cells, this method is not useful for the study of the host response either to parasite infection or parasite carcinogenesis induction.

Another alternative has been the development of three-dimensional (3D) approaches. For instance, the HCT-8 organoid model has been applied in order to replicate the intestine and thus assess the human epithelial cell response to parasite infection¹⁹. However, this interesting model is also based on the use of transformed cells, and these cells are not able to reliably mimic the host-parasite interactions in a normal physiological way. The use of a primary culture of intestinal epithelial cells²⁰ allowed *in vitro* infection by *Cryptosporidium* for up to 5 days. While this model supported *Cryptosporidium* infection better than conventional *in vitro* models, it remains limited in time.

In fact, the current challenge in systems biology is to explore the intricate dynamics that orchestrate the cellular microenvironment in which complex signaling pathways oversee the cellular phenotype in relation to tissues formation, function and pathophysiology²¹. Two-dimensional (2D) cell culture models remain limited in contributing to the understanding of the microenvironment that contributes significantly to the cell response. Therefore, it is believed that tissue culture can enable, in a more physiological manner, the response of the cell when infected. Moreover, the morphology and homeostasis of the intestinal epithelium arise from a highly regulated balance between cell proliferation, motility, differentiation and apoptosis²². This equilibrium is harmonized by significant crosstalk between the epithelium and adjacent cell layers²³. Therefore, as soon as the intestinal epithelial cells are removed from the basement membrane, apoptosis is initiated within a few hours²⁴. This evidence suggests that the only efficient way to study normal intestinal epithelial physiology *in vitro* may be an organ culture system, in which the epithelial cells remain in contact with the underlying mesenchyme. Consequently, the main objective of the present study was to develop a three-dimensional (3D) adult murine culture model of *Cryptosporidium* infection using colon sections from SCID mice, shown in the past to be susceptible to infection by the parasite^{8,11}, and to apply this model to investigate cancer development *in vitro*. Models from primary intestinal epithelial cells or explants have been used successfully to model infection with other pathogens, such as *Candida*²⁵ or HIV²⁶. In addition, while animal models remain very useful for the study of host-pathogen interactions, the advantages of finding alternative methods include the reduction in the number of animals used, the ability to obtain results quickly, decreased experimentation costs and better control of the experimental variables²⁷.

Results

Validation of a colonic explant as a tissue culture system

Histological analysis

In order to develop a primary intestinal model for *Cryptosporidium* and to study parasite-induced neoplasia development, firstly 18 three-dimensional tissue samples of adult SCID mouse colon were

cultured on membrane inserts for up to 35 days. Mouse colonic sections obtained immediately after dissection were used as controls for immunohistochemical characterization. When the orientation of the tissue was respected and the intestinal lumen was positioned at the air-medium interface, a high prismatic epithelium covered the surface of the tissue culture and formed crypt-like structures, and the presence of microvilli was noted on the apical surface of epithelial cells. Culture explants were stopped periodically and, in 13 explants kept for 35 days, normal histological organization specific to epithelium was observed (Fig. 1 A-D). This tissue preservation was characterized by nuclei located in a basal position, connective tissue showing collagen, fibroblasts, and smooth muscle cells. A well-organized basal lamina could also be detected. In addition to the crypt-like structures, large cyst-like formations could also be observed. These cysts lined by an epithelium developed inside the three-dimensional culture. No bacterial contamination was detected throughout the period of culture.

Cell proliferation and cytotoxicity assay

Using Ki67 labeling on 5 µm thick paraffin sections, proliferating cells were identified within the epithelial cell layer (Fig. 2 A-D). In parallel, cellular cytotoxicity was evaluated by measuring the rate of lactate dehydrogenase (LDH) in the culture media (Table 1). The LDH concentration was evaluated for nine samples over seven different cases (different culture periods). Of the two interactions, sample and time in culture, none was associated with a significantly low p-value. Therefore, there was no significant evidence to suggest that the LDH concentration was increased significantly. This observation led us to consider that there was no evidence of cellular cytotoxicity.

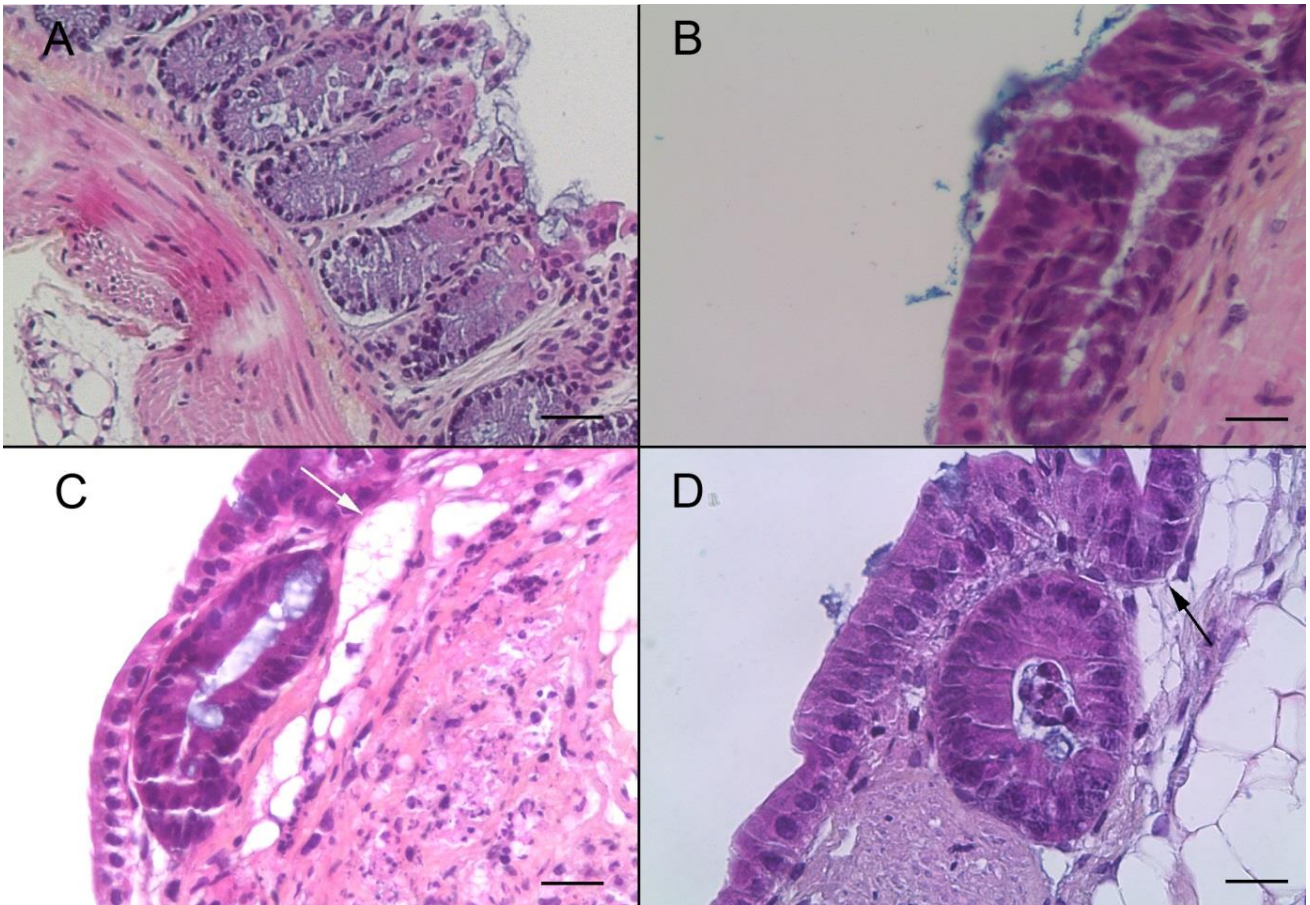


Figure 1: Histological validation of the murine colonic explant culture system **(A)** Hematoxylin eosin safranin (HES) staining of a normal colon section of an uninfected SCID mouse. Scale bar, 40 μm . **(B)** HES staining of a colonic explant section after 14 days of culture showing good tissue preservation with a characteristic collagen fiber and crypt-like structures (white arrow). Scale bar, 20 μm . **(C-D)** HES staining of a colonic explant section after 21 and 30 days of culture, respectively. Tissue preservation was confirmed with a presence of high prismatic epithelium, basal position of nucleus, a well-organized basal lamina and the presence of crypt-like structures (black arrow (D)). Presence of large cyst-like formations (white arrow (C)). Scale bars, 20 μm .

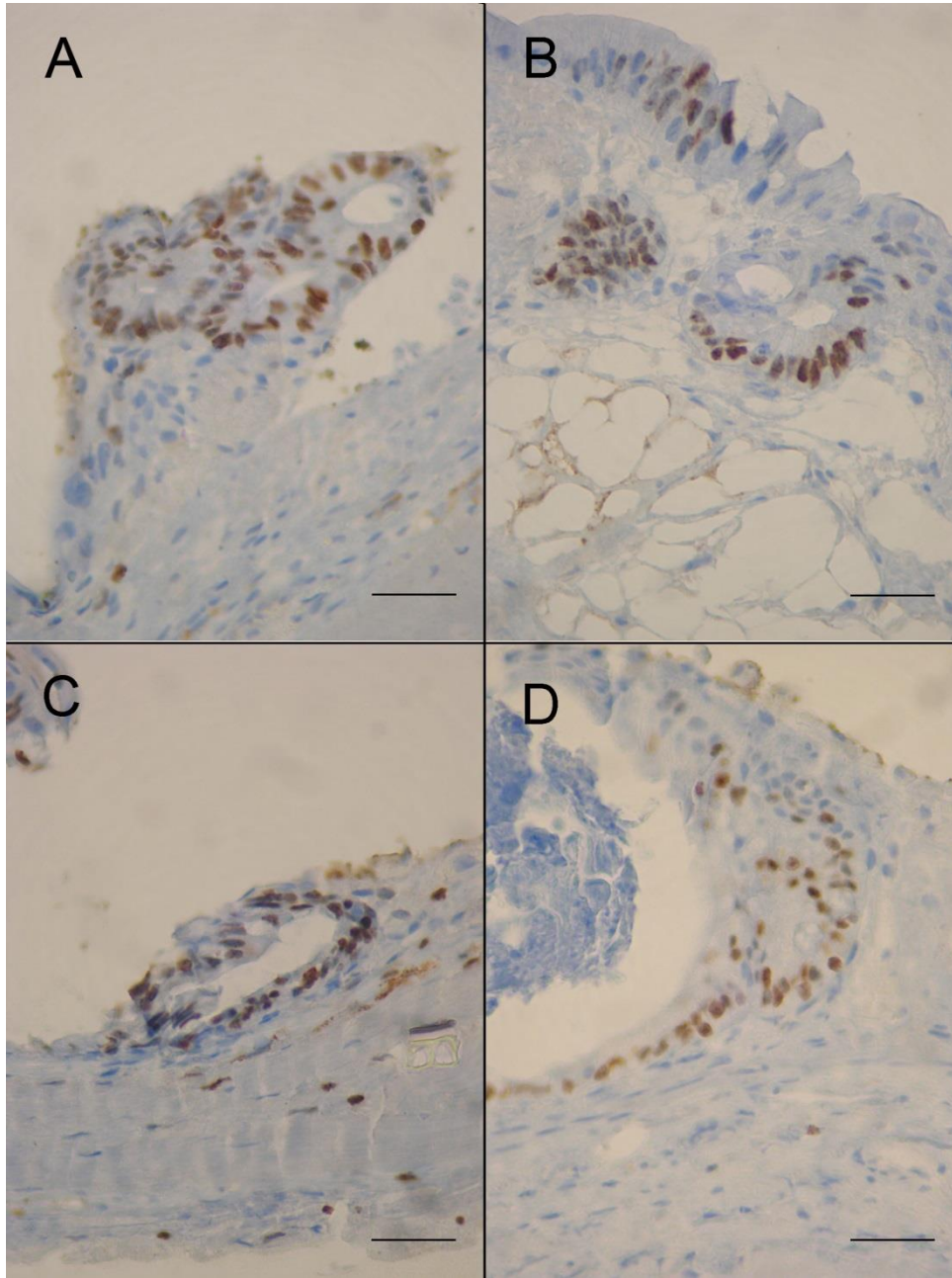


Figure 2. Expression of the Ki-67 marker of proliferation in the epithelium of murine colonic explants **(A-D)** Ki-67 expression is maintained within the epithelial cell layer throughout the culture period in explant sections of mouse colon after 8 (A), 12 (B), 14 (C) and 30 (D) days of culture respectively. Ki67 labeling seems to gradually diminish with increasing culture time. Scale bars, 25 μ m.

Table 1. Cell cytotoxicity assay throughout the period of the explant culture. **(A)** Mean LDH concentrations (IU/L) released into the supernatant of the explant culture until day 35 (D35). **(B)** Degrees of freedom, F-value and p-value of the ANOVA test.

Variable	Time in culture (days)	Number of pooled samples	Mean*	SD	Median
LDH concentration (IU/l) A	12	9	53.27	35.5	45.2
	14	6	52	33.3	46.35
	26	6	57.1	32.7	42.1
	28	6	62.96	31.9	52.3
	30	3	54	38.9	39.2
	32	3	62.7	37.1	41.5
	35	3	62.2	36.9	40.5

Source	Degrees of freedom	F-value	p-value
Subject	8	1.94	0.106
Day B	6	0.14	0.990

*The LDH values were compared to a negative control (LDH=50.1 IU/l) and a value measured when tissue was damaged (CN, LDH=130.1 IU/l). Data is from minimum 3 replicates of 7 individual samples.

Explant infection with *C. parvum*

Parasite detection in histological sections

After standardization of the culture system, the explant culture was prepared for the infection assay with 25 or 250 excysted *C. parvum* oocysts diluted in 10 µL of culture medium. It was previously reported that, after 3 days of culture, the intestinal epithelium will undergo a subsequent reorganization and will be completely renewed²⁸. Based on this observation, 36 tissues were infected after 8 days in culture in order to assure complete renewal of the epithelium and tissue adaptation to the culture system. From 4 days PI and until 22 days PI, the presence of intracellular stages of *Cryptosporidium* located in an apical position was confirmed in 27 sections of infected explants stained with hematoxylin, eosin and safranin (Fig. 3). Two out of 27 showed a flattened epithelium, probably due to the explant handling. In all 27 live explants (Table2), extracellular stages (oocysts) were also observed. No bacterial contamination was detected during the culture period.

Parasite detection in culture medium

To identify the presence of newly formed oocysts, the culture medium collected in the first 4 days PI was discarded in order to eliminate oocysts not excysted during explant infection. Subsequently, 100 µl from each well were collected every 48 hours until 20 days PI. The collected samples were pooled together and an immunostaining was performed. Newly formed oocysts with a diameter of 5 µm were identified (Figure 4)

Parasite count (or parasite number assessment or estimation) by qRT-PCR

Though microscopy can provide information about parasite replication, a more precise quantification of parasites was necessary to validate the model system. In order to perform quantitative analysis of *Cryptosporidium* DNA, 500 µl of the culture medium were collected every 48 hours starting at 96 h PI. All the 500 µL of renewed media from each time point were pooled. After *Cryptosporidium* DNA extraction from the pool of total collected culture volume. Final DNA was diluted in a total volume of 100µL and 5µL of this volume was used for qPCR. In order to evaluate the overall DNA quantity, the values obtained were then multiplied by 20 (5µL X 20 = 100 µL). The standard curves generated showed a relationship between the Ct value and the log transformed number of copies over almost five orders of magnitude of the DNA dilution. The correlation coefficient obtained by linear regression analysis of three independent experiments was $R^2 = 0.9$ (Fig. 5A). The number of *Cryptosporidium* copies was quantified by interpolation of the corresponding Ct values in the standard curves. In total, all 6 viable samples were infected by *Cryptosporidium* and a multiplication of the genomic quantity of the parasite was confirmed. The parasite load in samples infected with 25 oocysts was significantly higher when compared with samples infected with 250 oocysts (Fig. 5B).

Study of *C. parvum*-induced neoplasia development

The morphological changes in intestinal cells induced by *C. parvum* were investigated by microscopic analysis of infected explants. Typical intraepithelial neoplasia of low grade characterized by loss of cell-to-cell contact was observed. The glands were slightly crowded, while having a similar size and shape and the interglandular space was reduced. Mucus droplets were also very restricted compared to the control. The overlapping epithelium presented loss of nuclear polarity, with a slightly pseudostratification, and slightly to moderately hyperchromatic nuclei were observed (Fig. 6A-B). Associated with these observations, extracellular forms of *C. parvum* were detected.

Table 2. Summary of histological observations according to the initial doses of infection, the infected explant and the day of culture. N/A: not applicable

Explant identification (D=day P.I.)	Infective dose of <i>C. parvum</i>	Epithelium conservation	Presence of parasites according to microscopic observation	Presence of neoplasia
25(1)-D10	25 oocysts	Yes	No	No
25(2)-D10		Yes	No	No
25(3)-D10		No	N/A	N/A
25(1)-D12		Yes	No	No
25(2)-D12		No	N/A	N/A
25(3)-D12		Yes	No	No
25(1)-D14		Yes	No	No
25(2)-D14		No	N/A	N/A
25(3)-D14		Yes	Yes	No
25(1)-D21		No	N/A	No
25(2)-D21		Yes	Yes	No
25(3)-D21		Yes	Yes	No
25(1)-D30		Yes	Yes	No
25(2)-D30		Yes	Yes	No
25(3)-D30		No	N/A	N/A
25(1)-D32		Yes	Yes	No
25(2)-D32		Yes	Yes	No
25(3)-D32		No	N/A	N/A
25(1)-D35		No	N/A	N/A
25(2)-D35		Yes	Yes	Yes
25(3)-D35		Yes	Yes	Yes
250(1)-D10	250 oocysts	Yes	Yes	No
250(2)-D10		Yes	Yes	No
250(3)-D10		Yes	Yes	No
250(1)-D12		No	N/A	N/A
250(2)-D12		No	N/A	N/A
250(3)-D12		Yes	Yes	No
250(1)-D14		Yes	Yes	No
250(2)-D14		Yes	Yes	No
250(3)-D14		Yes	Yes	No
250(1)-D21		No	N/A	No
250(2)-D21		Yes	Yes	No
250(3)-D21		Yes	Yes	No
250(1)-D30		Yes	Yes	No
250(2)-D30		No	N/A	N/A
250(3)-D30		Yes	Yes	N/A

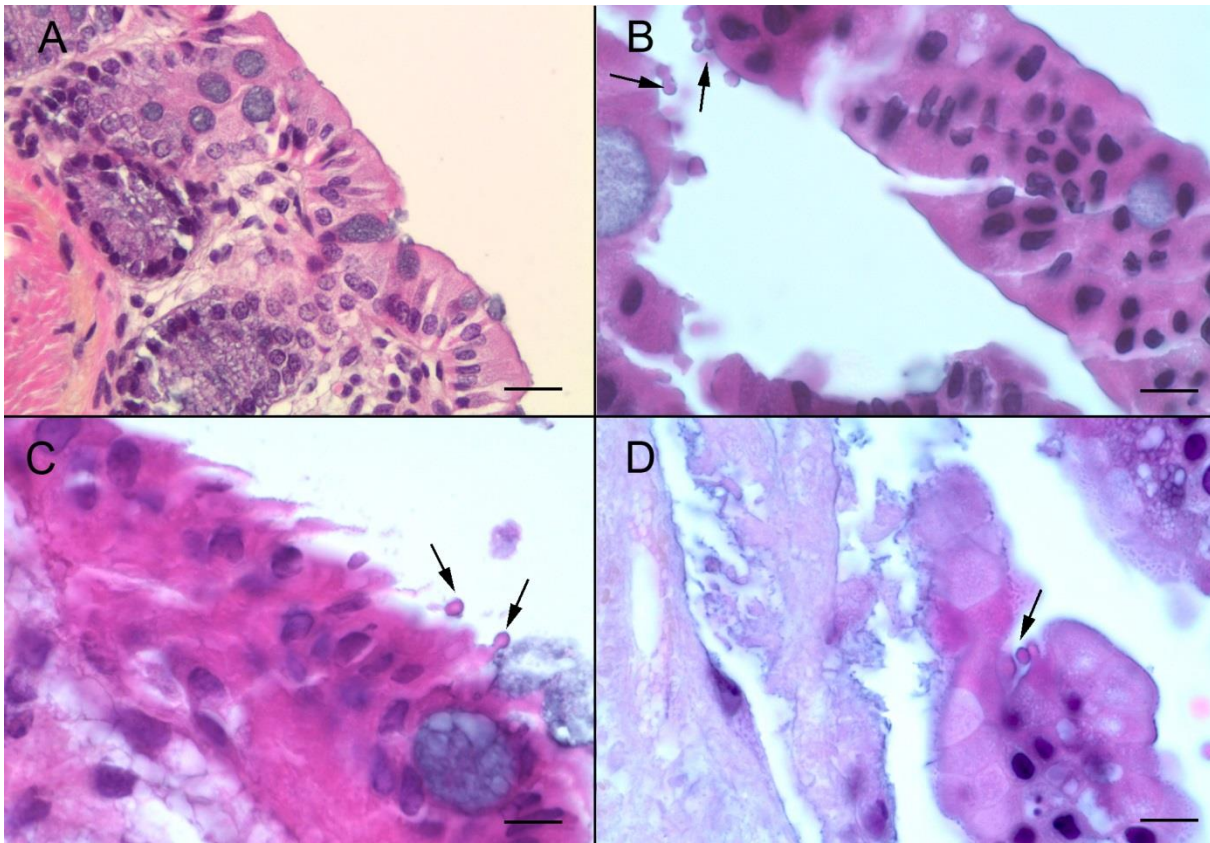


Figure 3: *C. parvum* infection of the murine colonic explant system **(A)** Hematoxylin eosin safranin (HES) staining of an uninfected SCID mouse colon section. Scale bar, 15 μ m **(B)** HES staining of a colonic explant section after 12 days of culture followed of 4 days after infection with *C. parvum*. Developmental stages of *C. parvum* are observed in the apical position (arrows) within the intestinal epithelial cells. Scale bar, 10 μ m **(C)** HES staining of cultured colonic explant sections after 14 days post-infection with *C. parvum* showing extracellular and intracellular stages of the parasite (arrows). **(D)** HES staining of cultured colonic explant sections at 22 days post-infection with *C. parvum* showing parasites within the intestinal epithelial cells. Scale bar, 25 μ m



Figure 4: Presence of *Cryptosporidium parvum* oocysts in the medium culture pooled after 27 days PI and stained by immunofluorescence (fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-*Cryptosporidium*). Scale bar, 5 μ m

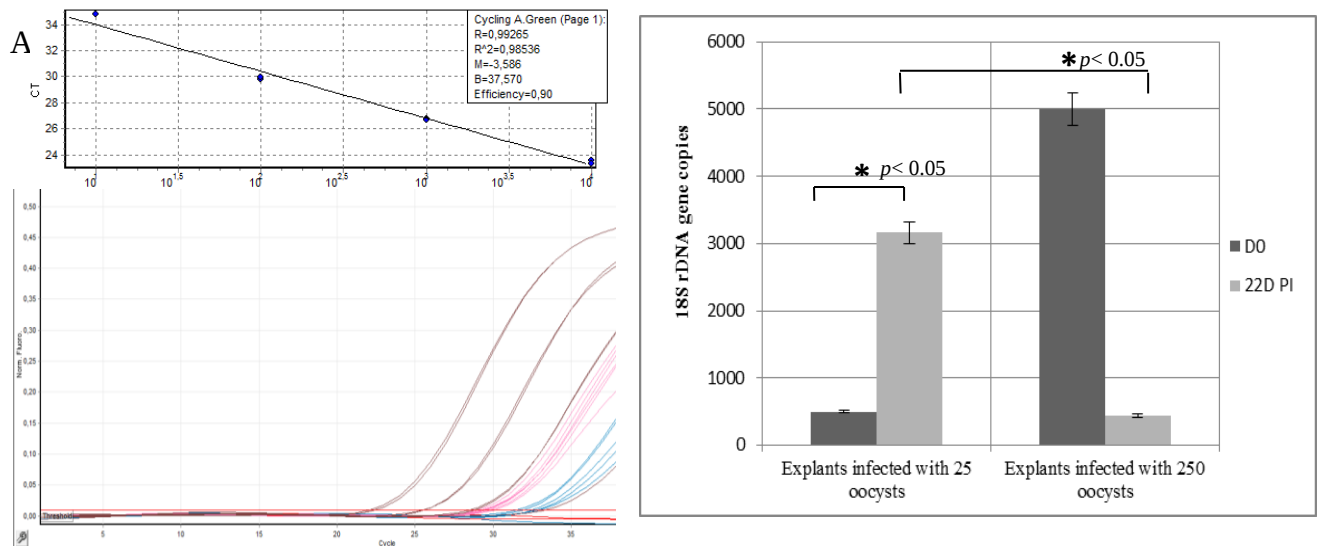


Figure 5. Quantification of *Cryptosporidium* 18S rDNA gene copies by qPCR in the supernatant of explants. **(A)** Standard curves corresponding to the amplification plots and **(B)** Comparison between explants infected with 25 oocysts (1) and 250 oocysts (2), respectively. Sample t-test was performed to compare values according to parasite concentrations at day 0 (D0) and 22 days PI (22D). Data is presented as mean number of copies $\pm$ SEM of three individual samples.* indicates significant differences between the mean number of copies on the day of infection and the mean number of copies 22 days PI for tissues infected with 100 sporozoites (25 oocysts) and between explants infected with 100 sporozoites (25 oocysts) and 1000 sporozoites (250 oocysts).

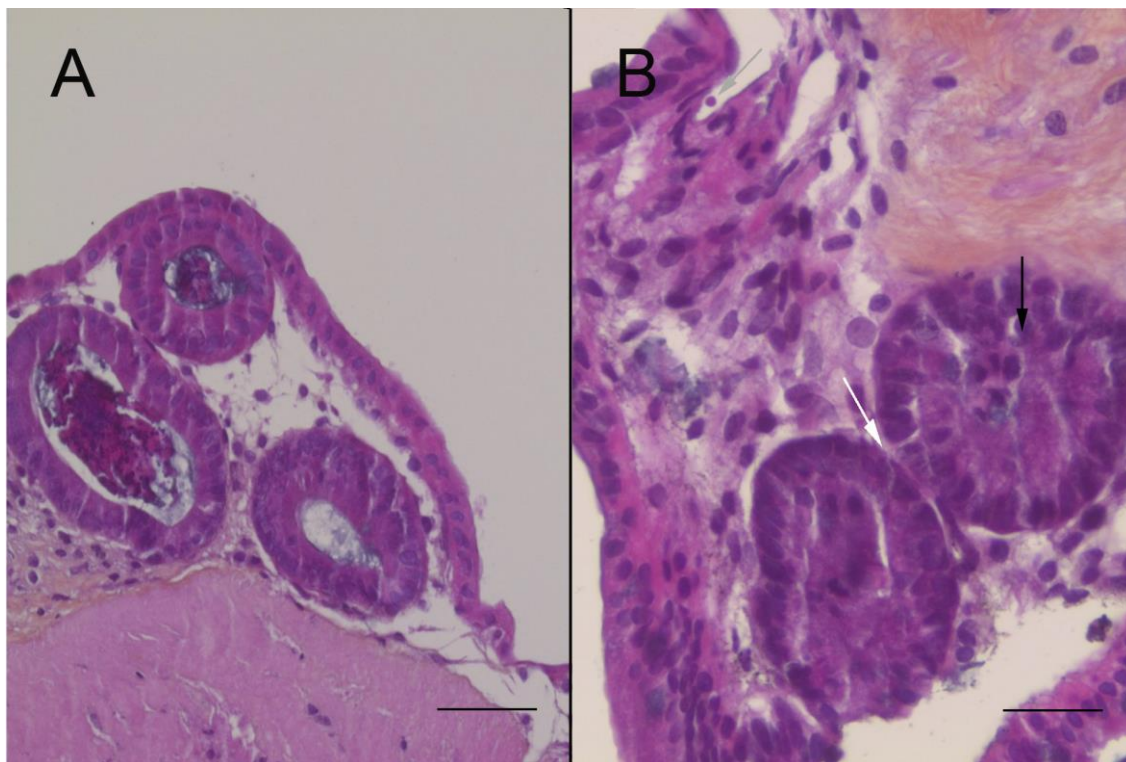


Figure 6. Development of neoplasia in the murine colonic explant model. **(A)** Hematoxylin eosin safranin (HES) staining of an uninfected colonic explant section showing a normal epithelial structure. Scale bar, 65 μ m. **(B)** HES staining showing a low-grade intraepithelial lesion in a colonic explant after 27 days of infection with *C. parvum* (grey arrow) characterized by: (i) loss of cell-to-cell contact (ii) reduction of the interglandular space (white arrow) (iii) loss of nuclear polarity with slight pseudostratification (black arrow). Scale bar, 25 μ m.

Discussion

In the present study, we established for the first time an explant culture model for *C. parvum* from adult mouse colon in an *in vivo*-like environment, and were able to maintain the infected culture for up to 35 days.

In a first step preceding infection by the parasite, a culture system maintaining the intestinal tissue from a colonic mouse on membrane inserts at the interface between air and a complex culture medium was validated. This model seems to ensure an adequate *in vitro* nutrition and oxygen supply²⁹. The same conclusion was obtained in a similar experiment when pig colon was cultured at the liquid-gas-tissue interface³⁰. The tissues in culture were covered by a high prismatic epithelium similar to the intestinal epithelium observed *in vivo*. After 8 days *in vitro*, the presence of microvilli was observed at the apical surface of epithelial cells. At this point, Ki-67 labeling allowed the identification of proliferating epithelial cells at the surface of the culture model that was maintained throughout the culture period. Cells proliferating along the length of the intestine throughout the culture period were closely associated with the basement membrane as the development proceeded. It has been reported that this observation could be associated with apoptosis, and it is known that this proliferating process normally plays a significant role in the mechanism by which a polarized epithelium is remodeled³¹. By using a cytotoxicity assay, we showed that no significant lysis of explant cells occurred during at least 35 days after the organotypic culture. Furthermore, all the characteristics of the epithelial barrier were preserved, such as epithelial cells, basal lamina and fibrocyte-like cells underneath the basal lamina. These observations indicated that epithelial progenitor and stem cells differentiated and that the stem cell compartment could be maintained for up to 35 days *in vitro*. After 35 days of culture, the epithelium started to flatten and fewer cells were labeled with Ki-67. Even though the fluctuation in the LDH value was not significant, we hypothesized that the tissue began to suffer after 35 days, losing the regeneration capacity and some of its characteristics such as the high prismatic organization.

Our results were compared with the data reported previously. Interestingly, similar data was obtained by Bareiss *et al.*²⁸, knowing that they succeeded in preserving the living culture for only two weeks. A cultivation system similar to the one we developed here was also described by Metzger *et al.*²⁹. However, these authors estimated that their system could be used for a maximum of 15 days. Moreover, even though the same scaffold membrane was used in both systems, the size of pores was slightly larger in our model. In addition, unlike these two previous systems, the culture medium was supplemented with fetal calf serum in our model, as used by Defries and Franks³².

We believe that the culture medium played a primary role in the preservation of the tissue and the regulation of cell proliferation, thus contributing to maintaining the epithelium for at least 35 days.

Due to the fact that only 10% of FCS (fetal calf serum) was added, the medium was supplemented with other additives such as glucagon and insulin/transferrin/selenite. Additionally, KGF (keratinocyte growth factor), another additive we used, was found to enhance epithelial restitution, presumably by mediating its effects through the basolateral pole of the epithelial monolayer³³.

Another *ex vivo* method was developed for studying mucus formation, properties, and thickness in human colonic biopsies and mouse small and large intestine explants³⁴. Besides having a different medium and scaffold, two major differences were noticed between this model and the one described herein. The first was related to the tissue support, since the tissue was maintained in our study at the air-medium interface, thus preventing it from damage. In fact, only the explant with this orientation was kept alive for 35 days. The second difference was related to the removal of the longitudinal muscle layer of the intestine which was also applied by Bansal and Labruyère³⁵. However, this layer was conserved in our approach to prevent additional damage to the tissue, since one of our purposes was to keep it alive for a longer period.

The results of this study highlight the important role of culture conditions, including the scaffold membrane, the position at the air-medium interface and the culture medium. Last but not least, all the previous work on colonic mice explants was done with an immunocompetent murine strain. In the present work, we used SCID mice (devoid of functional T and B cell lines) with a complementary dexamethasone treatment to complete the immune system depletion. Some previous results on cultured human fetal colon explants pointed out the involvement of the immune system in histological architecture disorganization³⁶. Furthermore, results obtained by Solaymani-Mohammadi *et al.*³⁷ highlighted immune-mediated alterations of the cell cytoskeleton in the intestinal epithelium. Several other tissue culture techniques have been described, but were restricted to embryonic tissues^{30,38–40}. However, the experimental manipulations of embryonic tissues for a long time are very limited, and their microenvironment remains primitive (compared to that of adult tissues). The system described herein allows easy monitoring of the experiments, respected the properties of the microenvironment and showed a high level of standardization and reproducibility.

In a second step, the feasibility of this *in vitro* system as a long-term culture model of *Cryptosporidium* was evaluated through infection experiments. Interestingly, this model was revealed to be sensitive to *C. parvum* infection. As expected, because of the low numbers of parasites in the initial inoculum, few extracellular stages of the parasite were observed in the early days of infection. As confirmed by microscopy, the asexual parasite forms within the cells of the digestive epithelium were abundant after 96 hours. Consistently, it has been reported that in mice infected with low inocula, the parasite excretion increased fast, reaching a mean oocyst shedding of more than 10,000 oocysts per gram of feces at 45 days PI. The few oocysts inoculated to mice probably showed

a high multiplication rate in the first two weeks PI¹². This increase in the parasite burden was also noticed in the chicken embryo tracheal infection model for *C. baileyi* after 72 h PI⁴¹. In a similar approach, human explants were used to determine gene expression in response to *Cryptosporidium* infection⁴². Ileal tissue was obtained from 3 individuals undergoing surgical procedures for unrelated noninfectious conditions. The authors were able to demonstrate that infection by *Cryptosporidium* was limited to epithelial cells and only in a minority of them. This was consistent with our HES observations showing few host cells infected with the parasite. Additionally, the supernatant obtained after 22 days PI contained newly formed oocysts positively stained with (FITC-) conjugated anti-*Cryptosporidium*. To confirm the multiplication of *Cryptosporidium* and track the infection, qPCR was performed on this sample and a high proliferation rate of the parasite was identified, particularly when the explant was infected with 25 compared to 250 oocysts. Consistently, the decrease in the mean rate of oocyst shedding after a high-challenge inoculum of parasite oocysts has been previously described in *Cryptosporidium*-infected animal models and human volunteers^{11,43}. This difference in parasite multiplication could be due to competition between parasites for the limited number of intestinal cells to infect. Interestingly, the rate of multiplication of the parasite in the explant system is probably higher, considering that only the number of parasites in the culture medium was quantified here and, for logistical reasons, intracellular forms of parasites infecting the tissue were not evaluated.

In a similar approach, Castellanos Gonzalez *et al.* developed a novel method for prolonged *in vitro* cultivation of primary human intestinal epithelial cells using intact crypts²⁰. The culture proliferated and remained viable for at least 60 days. However, after infection with *Cryptosporidium*, the culture was maintained only for 120 hours whereas our system culture is viable for 27 days. More recently, a 3D culture system using HCT-8 cells was adapted to the hollow fiber technology in order to provide an environment that mimics the gut by delivering nutrients and oxygen from the basal layer upward while allowing separate redox and nutrient control of the lumen for parasite development⁵. Using this technique, a high parasite multiplication was maintained for more than 6 months, producing approximately 1.10^8 oocysts/ml on day 1, compared with a production of 1.10^6 – oocysts/ml after 48 h in two-dimensional cultures. This system provides a unique method for high parasite production and continuous propagation, but it requires specialized equipment and is not easily scaled to be used as an experimental system for drug screening. Another limitation is that this culture process takes place in the “black box” structure that makes it difficult to observe the host-parasite interaction.

Because of the specific physiology and more complex cell organization of primary tissues, explant cultures may have a closer resemblance to the tissues observed *in vivo*⁴⁴. Recently, a 3D human intestinal model system was able to support *C. parvum* infections⁴⁵. The 3D intestinal model system

could be stably maintained for at least eight weeks in culture⁴⁶. Even though this model has specific features usually absent in 2D models, it remained dependent on transformed cells such as Caco-2 cells. The system supported the infection for at least 15 days, whereas the system described herein supported the infection for at least 27 days.

On the other hand, the ability of *C. parvum* to induce gastrointestinal neoplasia has been established in a rodent model⁸. Additionally, it was found for the first time that the alteration of signaling pathways, such as the Wnt signaling pathway, and host cell cytoskeleton network, seem to be major events during the development of *C. parvum*-induced neoplastic processes^{47,48}. Then, one of the goals of this study was the identification of a model for studying *C. parvum*-induced carcinogenesis. By infecting explants with the parasite, lesions corresponding to intraepithelial neoplasia were observed *in vitro* at 27 days PI, providing new evidence of the role of the parasite in the induction of carcinogenesis at least in experimental models. To our knowledge, this is the first description of a low-grade neoplasia induced after parasite infection in a 3D culture method. The aim of future studies will be to explore mechanistic insights of the *C. parvum*-induced neoplasia using this system that permits real-time monitoring of host-parasite interactions.

Conclusion

In summary, we described for the first time the development and characterization of a specialized 3D culture system for *C. parvum* from adult SCID mouse colon. In this system, the parasite completed its life cycle and produced newly formed oocysts. Compared to traditional 2D cultures, this system could be useful to investigate the time-dependent cellular mechanisms and factors involved in the regeneration and degeneration of host cells and a new and effective *in vitro* culture model for *C. parvum*, and perhaps for other intestinal pathogens. To our knowledge, this is the first 3D *C. parvum* continuous culture system modeling the physiopathological conditions *in vivo* thanks to the incorporation of the structural and mechanical properties that define the *in vivo* microenvironment⁴⁹. Furthermore, the development of colon neoplasia was reproduced in the present study by co-culturing the explants with the parasite. Since the explant retained intestinal characteristics, the method described herein should provide an improved tool for studying host-parasite interactions in a microenvironment highly similar to *in vivo* conditions. In conclusion, this system could also be helpful in reducing the number of animals used in experimentation models. Finally, since one of the reasons for the lack of treatment for *Cryptosporidium* is the absence of a suitable culture system, our model could provide a new alternative to drug screening. In addition, this methodology could have wide applicability to the investigation of infectious inflammatory and neoplastic diseases.

Methods

Animals

The animals were kept in aseptic conditions in an isolator and were regularly inspected to assess microbial and parasitological infections (including *Helicobacter* spp.). 9 SCID mice were administered 4 mg/L of dexamethasone sodium phosphate (Dex) (Merck, Lyon, France) via drinking water as previously described⁸ two weeks before euthanasia by carbon dioxide inhalation for tissue culture experiments. Experiments were conducted in the animal facility (PLETHA Pasteur) at the Institut Pasteur de Lille (research accreditation number A59107). The animal protocols were approved by the French regional ethics committee (approval number CEEA 112011).

Colon explant preparation

The tissue was prepared as previously described by Bareiss *et al.*²⁸ with some modifications. Before culture, the colon recovered from the animals was dissected and cleaned of fecal contents with cold Hank's Balanced Salt Solution supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) and metronidazole (50 µg/ml). After this cleaning process, the tissue was opened along its length and cut into 12 mm² pieces. The explants were then transferred to uncoated membrane inserts (Millipore CM, 0.45 µm pore size) and positioned in the respective well of a six-well plate. Each well was loaded with 1 ml medium consisting of HEPES buffered DMEM/F12, 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), L-glutamine (2 mM), insulin/transferrin/selenite mix (1:100), Albumax (1 mg/ml), hydrocortisone (1 µM), glucagon (14.3 nM), 3,3',5'-triiodo-L-thyronine (1 nM), ascorbate-2-phosphate (200 µM), linoleic acid (20 µM), estradiol (10 nM) and keratinocyte growth factor (50 ng/ml). The explants were cultured in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂ for up to 4 weeks. For each culture condition and time point stop, the experiment was performed three times. In order to prevent bacterial contamination, medium culture was filtered beforehand through 0.22 µm. The absence of bacterial contamination was screened by testing the medium culture renewed every 48 hours by plating onto culture media (Trypticase soy), at least 72 hours at 37 °C. This process was performed throughout the culture period for every explant.

C. parvum oocyst counting and concentration determination

C. parvum oocysts Iowa (purchased from Waterborne™, New Orleans, LA) were stored in phosphate-buffered saline (PBS) with penicillin, streptomycin, gentamycin, amphotericin B and 0.001% Tween 20 at 4°C until use. Oocyst viability and the estimation of the excystation rate were assessed by a protocol as previously described⁵⁰. PBS complemented with 0.25% (wt/vol) trypsin and 0.75% (wt/vol) taurocholic acid were used to incubate the oocysts for 1 h at 37°C. Subsequently, 500 events corresponding to intact or empty oocysts were counted under DIC optics (Nomarski) with

a Nikon 80i microscope (Nikon, Tokyo, Japan) at 630× magnification. The excystation rate was calculated using the equation: (number of empty oocysts/total intact and empty oocysts) × 100.

The infectivity assay used, was previously developed by Keegan *et al.*⁵¹. Briefly, after a washing step by centrifugation at 1800 g for 20 min at room temperature, the oocysts were incubated in acidified water (pH 2.4) containing 0.025% (wt/vol) trypsin at 37°C for 20 min to trigger excystation. After a second centrifugation step at 1800 g for 10 min, the oocysts were suspended in a maintenance medium. The maintenance medium consisted of RPMI 1640 medium with 2 mM L-glutamine, 15 mM HEPES buffer, 23 mM sodium bicarbonate, 5 mM glucose, 0.5 µM folic acid, 7 µM 4-aminobenzoic acid, 0.1 µM calcium pantothenate, 50 nM ascorbic acid, 1% (vol/vol) heat-inactivated fetal calf serum, 210 µM gentamycin, 170 µM streptomycin and penicillin (105 U/L). During the entire process, all solutions were filtered at 0.22 µm.

C. parvum explant infection

Based on the excystation rate, the volume needed to inoculate the explant was calculated. After 8 days of culture, the explants were infected with either 100 or 1,000 sporozoites (corresponding to 25 or 250 oocysts, respectively) of *C. parvum* contained in 10 µl of the maintenance culture medium that was pipetted onto each well. For the negative control, 10 µl of this medium were added to the tissue culture. The culture medium was renewed every 48 hours.

Histological analysis and immunohistochemistry

The cultured explants were stopped periodically after 8, 10, 12, 14, 16, 21, 30 and 35 days after culture and then fixed in 10% formalin, and embedded in paraffin. Sections of 5 µm thickness were stained with hematoxylin and eosin (Leica Autostainer-XL, Rueil-Malmaison, France) or deparaffinized, rehydrated through serial dilution of alcohol and washed in PBS (pH 7.2) for immunohistochemical analysis. Lesions at different sites were scored as previously¹². Sections were examined using a Leica DMRB microscope equipped with a Leica digital camera connected to an Imaging Research MCID analysis system (MCID software, Cambridge, United Kingdom).

Cell proliferation assay (Ki-67 labeling)

The expression of Ki-67 in the intestinal epithelium was assessed in 5 µm-thick sections using a monoclonal rat anti-mouse Ki-67 antibody (dilution 1:25) (M7249, Dako, Denmark), as previously described¹¹ and following the procedure recommended by the supplier.

Cell cytotoxicity assay

The LDH was used as a marker of tissue breakdown and/or cell viability. Then 250 µL of the culture medium was centrifuged at 10,000 g for 5 min. The supernatant was recovered and tested for the quantitative determination of LDH activity using the UniCel® DxC 600/800 system. Briefly, this system was based on an enzymatic method that measures LDH activity using the LD-P (lactate

dehydrogenase reagent, pyruvate→lactate) reagent. In the reaction, LD-P catalyzes the reversible reduction of pyruvate to L-lactate with the concurrent oxidation of reduced β -nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) to β -nicotinamide adenine dinucleotide (NAD). The system monitors the change in absorbance at 340 nm. This change in absorbance is directly proportional to the activity of LD-P in the sample and is used to calculate and express the LD-P activity.

Real-time quantitative PCR (qPCR) assay

500 μ l of the medium collected every 48 h was used for qPCR starting at 4 days PI. For each well, the culture medium recovered throughout the culture was pooled. The total volume was centrifuged and a DNA extraction was performed after a step of proteinase K digestion overnight, using the NucleoSpin tissue kit (Machery Nagel, Duren, Germany) following the manufacturer's instructions. Real-time quantitative PCR (qPCR) assays were performed using a *Cryptosporidium* TaqMan assay⁵². The qPCR was designed to detect the presence of *Cryptosporidium* DNA and amplified a DNA fragment located in the 18S rDNA gene (GenBank accession no. EU675853.1, positions 33 to 211). The forward (5'CATGGATAACCGTGGTAAT3') and reverse (5'TACCCTACCGTCTAAACTG3') primers were designed to amplify a 178 bp fragment. A TaqMan probe homologous to a conserved region of the sequence (Pan-crypto, FAM-CTAGAGCTAATACATGCGAAAAAA-MGB-BHQ [FAM, 6-carboxyfluorescein; MGB, minor-groove-binding ligand; BHQ, black hole quencher]) was designed to detect *Cryptosporidium*. Each qPCR was performed in a 25 μ l reaction mixture containing 1X of LightCycler 480 Probes Master 2X, 200 nM of each *Cryptosporidium* primer, 10 μ M of the *Cryptosporidium* probe and 5 μ l of the DNA sample. The qPCR reactions were performed on a Rotor-Gene 6000 instrument (Corbett Research, Qiagen, France) and included an initial denaturation at 95°C for 15 min followed by 49 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing/extension at 60°C for 1 min. Fluorescence acquisition was performed immediately following each annealing/extension step. All samples were measured in triplicate in each assay and negative controls without template were included in each qPCR run. Amplification data was obtained from the Rotor-Gene 6000 software.

Immunomagnetic separation (IMS) and fluorescence immunoassay (FI)

The detection and quantification of the oocyst shedding from a pool of culture medium obtained between 48 h PI and until the end of the culture was performed by IMS using Dyna-beads as previously described¹¹. Then, 10 μ l of oocyst suspension was placed on immunofluorescence slides and labeled with a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-*Cryptosporidium* spp. monoclonal antibody (Cellabs, Brookvale, New South Wales, Australia).

Statistical analysis

To estimate whether the LDH concentration changes between measures performed at different time intervals, the repeated-measures ANOVA test was used which is defined as the measurement of the same characteristic on each case or subject at several different times or under several conditions⁵³. In this study, the null hypothesis (H_0) was that the LDH concentration means were equal for all explant samples and across the experimentation time. The alternative hypothesis (H_A) was that at least one LDH concentration mean would be different. The LDH concentration was considered the response. The day and the subject were considered the fixed and random factors respectively. If the p-value >0.05 , H_0 was accepted and H_A rejected. For each test, we planned to report the degrees of freedom (DF), the F and p values. To compare the mean LDH concentration of each subject to the reference concentration of 50.1 (IU/L), a two-tailed one-sample T-test was performed. To account for multiple comparisons, the Bonferroni correction for the five comparisons, which renders a p-value threshold of 0.01 was used. To compare the mean genomic quantity of the 18s rDNA after 22 days of infection and according to the infective doses, a two-tailed one-sample T-test was executed. All statistical analyses were performed using Minitab® version 17.3.1 (Minitab Inc., State College, Pennsylvania).

References

1. Ryan, U., Fayer, R. & Xiao, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology* **141**, 1667–1685 (2014).
2. Squire, S. A. & Ryan, U. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: current and future challenges. *Parasit. Vectors* **10**, 195 (2017).
3. Ryan, U. & Hijjawi, N. New developments in *Cryptosporidium* research. *Int. J. Parasitol.* **45**, 367–373 (2015).
4. Checkley, W. *et al.* A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *cryptosporidium*. *Lancet Infect. Dis.* **15**, 85–94 (2015).
5. Morada, M. *et al.* Continuous culture of *Cryptosporidium parvum* using hollow fiber technology. *Int. J. Parasitol.* **46**, 21–29 (2016).
6. Sulzyc-Bielicka, V. *et al.* Cryptosporidiosis in patients with colorectal cancer. *J. Parasitol.* **93**, 722–724 (2007).
7. Johnson, J., Filipovich, A. H. & Zhang, K. X-Linked Hyper IgM Syndrome. in *GeneReviews*(®) (eds. Pagon, R. A. *et al.*) (University of Washington, Seattle, 1993).
8. Certad, G. *et al.* *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma. *Infect. Agent. Cancer* **2**, 22 (2007).
9. Certad, G. *et al.* Fulminant cryptosporidiosis after near-drowning: a human *Cryptosporidium parvum* strain implicated in invasive gastrointestinal adenocarcinoma and cholangiocarcinoma in an experimental model. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1746–1751 (2012).

10. Certad, G. *et al.* Fulminant cryptosporidiosis associated with digestive adenocarcinoma in SCID mice infected with *Cryptosporidium parvum* TUM1 strain. *Int. J. Parasitol.* **40**, 1469–1475 (2010).
11. Certad, G. *et al.* Development of *Cryptosporidium parvum*-induced gastrointestinal neoplasia in severe combined immunodeficiency (SCID) mice: severity of lesions is correlated with infection intensity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **82**, 257–265 (2010).
12. Benamrouz, S. *et al.* *Cryptosporidium parvum* Infection in SCID Mice Infected with Only One Oocyst: qPCR Assessment of Parasite Replication in Tissues and Development of Digestive Cancer. *PLoS ONE* **7**, e51232 (2012).
13. Vinayak, S. *et al.* Genetic modification of the diarrhoeal pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Nature* **523**, 477–480 (2015).
14. Karanis, P. & Aldeyarbi, H. M. Evolution of *Cryptosporidium* *in vitro* culture. *Int. J. Parasitol.* **41**, 1231–1242 (2011).
15. Müller, J. & Hemphill, A. *In vitro* culture systems for the study of apicomplexan parasites in farm animals. *Int. J. Parasitol.* **43**, 115–124 (2013).
16. Sifuentes, L. Y. & Di Giovanni, G. D. Aged HCT-8 cell monolayers support *Cryptosporidium parvum* infection. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7548–7551 (2007).
17. Koh, W., Thompson, A., Edwards, H., Monis, P. & Clode, P. L. Extracellular excystation and development of *Cryptosporidium*: tracing the fate of oocysts within *Pseudomonas* aquatic biofilm systems. *BMC Microbiol.* **14**, 281 (2014).
18. Aldeyarbi, H. M. & Karanis, P. The fine structure of sexual stage development and sporogony of *Cryptosporidium parvum* in cell-free culture. *Parasitology* **143**, 749–761 (2016).
19. Alcantara Warren, C. *et al.* Detection of epithelial-cell injury, and quantification of infection, in the HCT-8 organoid model of cryptosporidiosis. *J. Infect. Dis.* **198**, 143–149 (2008).
20. Castellanos-Gonzalez, A., Cabada, M. M., Nichols, J., Gomez, G. & White, A. C. Human primary intestinal epithelial cells as an improved *in vitro* model for *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* **81**, 1996–2001 (2013).
21. Huh, D., Hamilton, G. A. & Ingber, D. E. From Three-Dimensional Cell Culture to Organ-on-Chips. *Trends Cell Biol.* **21**, 745–754 (2011).
22. Wong, M. H., Hermiston, M. L., Syder, A. J. & Gordon, J. I. Forced expression of the tumor suppressor adenomatosis polyposis coli protein induces disordered cell migration in the intestinal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 9588–9593 (1996).
23. Dumortier, J. *et al.* Site-Specific Epithelial-Mesenchymal Interactions in Digestive Neuroendocrine Tumors. *Am. J. Pathol.* **156**, 671–683 (2000).
24. Bissell, M. J. & Radisky, D. Putting tumours in context. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 46–54 (2001).
25. Steele, C. & Fidel, Jr., P. L. Cytokine and Chemokine Production by Human Oral and Vaginal Epithelial Cells in Response to *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **70**, 577–583 (2002).

26. Fletcher, P. S. [b1] (analytic) *et al.* Ex vivo culture of human colorectal tissue for the evaluation of candidate microbicides (English). *AIDS Lond* **20**, 1237–1245 (2006).
27. Arora, T. *et al.* Substitute of Animals in Drug Research: An Approach Towards Fulfillment of 4R's. *Indian J. Pharm. Sci.* **73**, 1–6 (2011).
28. Bareiss, P. M. *et al.* Organotypical tissue cultures from adult murine colon as an in vitro model of intestinal mucosa. *Histochem. Cell Biol.* **129**, 795–804 (2008).
29. Metzger, M., Bareiss, P. M., Nikolov, I., Skutella, T. & Just, L. Three-dimensional slice cultures from murine fetal gut for investigations of the enteric nervous system. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **236**, 128–133 (2007).
30. Costa, M. O., Harding, J. C. S. & Hill, J. E. Development and evaluation of a porcine in vitro colon organ culture technique. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **52**, 942–952 (2016).
31. Kim, J. B. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin. Cancer Biol.* **15**, 365–377 (2005).
32. Defries, E. A. & Franks, L. M. An organ culture method for adult colon from germfree and conventional mice: effects of donor age and carcinogen treatment on epithelial mitotic activity. *J. Natl. Cancer Inst.* **58**, 1323–1328 (1977).
33. Werner, S. Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine Growth Factor Rev.* **9**, 153–165 (1998).
34. Gustafsson, J. K. *et al.* An ex vivo method for studying mucus formation, properties, and thickness in human colonic biopsies and mouse small and large intestinal explants. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **302**, G430–G438 (2012).
35. Bansal, D. *et al.* An ex-vivo human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**, e551 (2009).
36. Evans, C. M., Phillips, A. D., Walker-Smith, J. A. & MacDonald, T. T. Activation of lamina propria T cells induces crypt epithelial proliferation and goblet cell depletion in cultured human fetal colon. *Gut* **33**, 230–235 (1992).
37. Solaymani-Mohammadi, S. & Singer, S. M. Regulation of intestinal epithelial cell cytoskeletal remodeling by cellular immunity following gut infection. *Mucosal Immunol.* **6**, 369–378 (2013).
38. Qiu, L.-Q., Lai, W. S., Stumpo, D. J. & Blackshear, P. J. Mouse Embryonic Fibroblast Cell Culture and Stimulation. *Bio-Protoc.* **6**, (2016).
39. Coletta, R. *et al.* Bridging the gap: functional healing of embryonic small intestine ex vivo. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **10**, 178–182 (2016).
40. Walton, K. D. & Kolterud, A. Mouse fetal whole intestine culture system for ex vivo manipulation of signaling pathways and three-dimensional live imaging of villus development. *J. Vis. Exp. JoVE* e51817 (2014). doi:10.3791/51817

41. Zhang, S. *et al.* Chick embryo tracheal organ: a new and effective *in vitro* culture model for *Cryptosporidium baileyi*. *Vet. Parasitol.* **188**, 376–381 (2012).
42. Castellanos-Gonzalez, A. *et al.* *Cryptosporidium* infection of human intestinal epithelial cells increases expression of osteoprotegerin: a novel mechanism for evasion of host defenses. *J. Infect. Dis.* **197**, 916–923 (2008).
43. Chappell, C. L., Okhuysen, P. C., Sterling, C. R. & DuPont, H. L. *Cryptosporidium parvum*: intensity of infection and oocyst excretion patterns in healthy volunteers. *J. Infect. Dis.* **173**, 232–236 (1996).
44. Astashkina, A., Mann, B. & Grainger, D. W. A critical evaluation of *in vitro* cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. *Pharmacol. Ther.* **134**, 82–106 (2012).
45. DeCicco RePass, M. A. *et al.* Novel Bioengineered Three-Dimensional Human Intestinal Model for Long-Term Infection of *Cryptosporidium parvum*. *Infect. Immun.* **85**, (2017).
46. Chen, Y. *et al.* Robust bioengineered 3D functional human intestinal epithelium. *Sci. Rep.* **5**, 13708 (2015).
47. Certad, G., Viscogliosi, E., Chabé, M. & Cacciò, S. M. Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends Parasitol.* **33**, 561–576 (2017).
48. Benamrouz, S. *et al.* *Cryptosporidium parvum*-induced ileo-caecal adenocarcinoma and Wnt signaling in a mouse model. *Dis. Model. Mech.* **7**, 693–700 (2014).
49. Sung, K. E. & Beebe, D. J. Microfluidic 3D models of cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **79–80**, 68–78 (2014).
50. Dibao-Dina, A., Follet, J., Ibrahim, M., Vlandas, A. & Senez, V. Electrical impedance sensor for quantitative monitoring of infection processes on HCT-8 cells by the waterborne parasite *Cryptosporidium*. *Biosens. Bioelectron.* **66**, 69–76 (2015).
51. Keegan, A. R., Fanok, S., Monis, P. T. & Saint, C. P. Cell culture-Taqman PCR assay for evaluation of *Cryptosporidium parvum* disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2505–2511 (2003).
52. Mary, C. *et al.* Multicentric evaluation of a new real-time PCR assay for quantification of *Cryptosporidium* spp. and identification of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 2556–2563 (2013).
53. Crowder, M. J. & Hand, D. J. *Analysis of Repeated Measures*. (CRC Press, 1990).

Acknowledgments

This work was funded by grants from the “Les Hauts de France” region, the “Métropole Européenne de Lille” city, the Catholic University of Lille, the Institut Pasteur of Lille, the Centre Nationale de la Recherche Scientifique and the University of Lille.

We would like to thank Dr Peter Neckel and his team for their help and Nigel J. Clifford for the critical review of the manuscript.

Authors contribution

M.B. was involved in the study concept, the experimental design, the performance of experiments, acquisition, analysis and interpretation of data and wrote the manuscript. S.B.V. was involved in the ideas that led to this project and in the study concept, contributed to the design experiment, performance of experiments, acquisition, analysis and interpretation of data and critically revising of the manuscript. C.C, was involved in the analysis and interpretation of data and critically revised the manuscript. K.G, N.G, and M.C. were involved in the acquisition of data. B.P, A.M, G.F, V.C, P.G, provided the equipment and materials support. A.B was involved in the statistical analysis. V.S was involved in the ideas that led to this project, the experimental design and carefully revised the manuscript. E.V. was involved in the study concept and carefully revised the manuscript. J.F. was involved in the ideas that led to this project, the experimental design, the analysis and interpretation of data and carefully revised the manuscript. G.C. was involved in the ideas that led to this project and in the study concept, contributed to the design experiment, analysis and interpretation of data and critically revising of the manuscript.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Article 4 : Développement d'un dispositif de culture 3D microfluidique à partir d'explants entériques murins.

Titre : Developping of a microfluidic device for gut explant culture

Préambule: Cet article est en cours de rédaction et sera soumis à Biomicrofluidics

Résumé: Les systèmes de culture d'organes permettent d'imiter le microenvironnement physiologique présent *in vivo*. Ce microenvironnement joue un rôle important dans les processus physiologiques cellulaires. Néanmoins, les systèmes de culture traditionnels sont limités dans le respect des dimensions micrométriques présentes *in vivo*. La microfluidique offre alors un grand potentiel pour générer et maintenir ce type de culture. La technologie microfluidique peut mettre en place des dispositifs et des outils de contrôle des facteurs externes tels que le milieu de culture, la vitesse de changement de ce milieu et l'oxygénation. Ce niveau de précision ne peut être atteint dans une culture 3D conventionnelle.

Ainsi le but de cette étude est de concevoir un dispositif microfluidique pour la culture d'explant entérique. Trois colons de souris SCID-D ont été utilisés. 9 explants de 9 mm² ont été mis en culture. Le bon fonctionnement du dispositif et la validation de la culture ont été vérifiées. Les principaux résultats sont les suivants :

- 1 Conception et fabrication du dispositif en utilisant une membrane polycarbonate qui a été collée entre deux couches de PDMS en utilisant le traitement à l'APTES.
- 2 Quatre dispositifs de culture ont été branchés à une pompe en pression contrôlée par un programme dédié (Fluigent).
- 3 Trois des neuf des explants mis en culture ont été maintenus vivants pour une durée maximum de 8 jours, 4/9 ont commencé à présenter des signes de souffrance alors que 2/9 ont été complètement nécrosés au bout de 8 jours de culture.

En conclusion, ces travaux présentent le premier dispositif de culture d'explant entérique qui a maintenu un explant vivant pendant 8 jours. Des étapes supplémentaires de mise au point seront nécessaires pour valider une plus longue durée de culture (plusieurs semaines). Ce dispositif semble être prometteur pour l'étude de pathologies digestives.

Ma contribution dans cette étude a été la suivante:

- Participation à la conception de l'étude
- Réalisation des expériences
- Analyse des résultats
- Rédaction de l'article

Development of a microfluidic device for gut explant culture

Martha Baydoun^{1,2,3}, Anthony Treizeibré³, Jérôme Follet^{2,3}, Sadia Benamrouz Vanneste^{1,4}, Colette Creusy⁵, Baptiste Delaire⁵, Anthony Mouray⁶, Eric Viscogliosi¹, Gabriela Certad^{1,7}, Vincent Senez³

¹: Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR 8204 – CIIL – Centre d’Infection et d’Immunité de Lille, Lille, France ²: ISA-YNCREA Hauts de France 59046 Lille Cedex, France. ³ Univ. Lille, CNRS, ISEN, UMR 8520 - IEMN, Lille F-59000, France. ⁴: Ecologie et biodiversité, Faculté Libre des Sciences et Technologies de Lille, Univ. Catholique de Lille, Univ. de Lille, France ⁵: Service d’Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Groupe Hospitalier de l’Université Catholique de Lille, France ⁶: Plateforme d’Expérimentations et de Hautes Technologies Animales, Institut Pasteur de Lille, 59021 Lille, France ⁷: Département de la Recherche Médicale, Groupement des Hôpitaux de l’Institut Catholique de Lille (GHICL), Faculté de Médecine et Maïeutique, Université Catholique de Lille.

Abstract

Organ culture systems are becoming crucial to mimic the physiological microenvironment present *in vivo*. Microfluidics offers a great potential in generating and maintaining this type of culture. Recent advances in microfluidic devices can acquire a level of precision control that could not be achieved in a conventional 3D culture. In this article, we will present a new microfluidic device capable of maintaining a murine enteric explant culture for 8 days. This encouraging tool could be used to investigate some biological mechanisms that are not feasible in a traditional type of culture nor in living animals.

Introduction

Microfluidics, the technology characterized by the precise manipulation of fluids using a microscale device [1] is believed to enhance the capabilities of investigators in biology and medical research. In fact, the microfluidic technology can create a platform for engineering highly complex and dynamic microenvironments that are controllable, reproducible and optimizable [2]. Furthermore, in the last few years, microfluidics has gained an importance when it comes to enhance the physiological relevance of three-dimensional (3D) cell culture by allowing spatial and temporal control over fluids in micrometer-sized channels [3]. Nowadays, the most important drivers for the use of microfluidic techniques in 3D cell culture are the capacity of co-culturing cells in a spatially controlled manner over the signaling gradients generated by this device and the integration of a flow [4]. In fact, there is a crucial need to investigate normal and pathological biological events under native *in vivo* conditions (Development and applications of microfluidic devices for cell culture in cell biology). Consequently, the main objective of the present study was to develop a microfluidic device to culture

sections of colon from SCID (Severe Combined Immunodeficiency) mice. It is believed that the morphology and homeostasis of the intestinal epithelium depends on the crosstalk between the epithelium and the adjacent cell layers[5]. In order to preserve this crosstalk, culture explants from the colon were cultivated taking care that epithelial cells remain in contact with the underlying mesenchyme. The microfluidic device was fabricated using soft-lithography technology of PDMS and replicated molding. The tissue was incubated at 37°C with 5% CO₂. Histological analysis assays were performed to validate the tissue culture.

Material and Methods

Microfluidic device Setup

The microfluidic chip is composed of 4 parts: a microfluidic channel of 150 µm to distribute the medium, an upper part with a 8 mm punch to place the explant, two punches of 1 mm for the inlet and outlet channels, a polycarbonate microporous membrane with pores of 0.4 µm and a diameter of 25 mm, a down part of PDMS (Figure 1A,B and C).

The microfluidic chip is connected to the external system by tubing of 0,8 mm outer diameter and 0.5 mm inner diameter for inlet and outlet. A 4 ways microfluidic flow control system (Fluigent MFCS) with a range 0-350mb was used to create the flow below the micro-porous membrane supporting the explant. To choose the type of micro-porous membrane the pores densities have been taken into account. The flow resistance of this membrane was compared to the microchannel resistance in order to favorite the flow through the microchannel rather than by the micro membrane. We can remark that the relation between pressure and flow rate is linear like a simple microfluidic channel. A pressure of 20 mb was chosen at inlet to get a flow rate of 10 µL/min. Before beginning the experiment, all the system has been autoclaved at 120°C (chip, tubing, connectors and reservoirs) to ensure the sterility. Four parallel microfluidic devices were tested (Figure 1D). From these 4 devices, 3 were used with the explants culture and one was used as a negative control. In each device, 3 explants of 9 mm² were put in every chamber (Figure 1B). The medium waste was collected in 4 independent tubes. The absence of bacterial contamination was screened by plating the medium onto culture media (Trypticase soy), for at least 72 hours at 37° C. The explants cultured on the microfluidic devices were kept in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂ for up to 8 days. 10mb pressure was applied at the inlet of the device.

Microfluidic device preparation

The fabrication of the microfluidic network starts with the production of the master mold in silicon substrate (Siltronix Silicon Prime wafers CZ (Diameter: 76.2 +/- 0.3mm, thickness: 380 +/-25 μm , orientation : <100>, Type doping: P-Boron, Resistivity: 1-10 Ωcm)).

Selective etching of silicon is obtained by protection of the silicon surface with a resist mask. AZ15nXT negative photo-resist (from MicroChemicals) is spin-coated to obtain a 10 μm thick layer. The spin parameters are: speed=1500rpm, acceleration= 3000 rpm.s⁻¹, time 40s. The substrate is soft- baked during 3mins at 110°C on a hotplate and AZ15nXT is exposed to UV radiation at $\lambda = 365$ nm for 45 s @ 10mW. After this exposure step a post-exposure is realized on a hotplate during 1min at 120°C. Exposed resist is removed by the MIF 326 developer (from MicroChemicals) during 4min and rinsed with water during 15s. The substrate is etched by a deep reactive ion etching (DRIE) process, with C4F8 passivation and SF6 etching steps. This technique is called “Bosch” process and is performed with STS DRIE plasma equipment. The parameters are: C4F8 flow rate = 100 sccm - Passivation time = 2.2 s - RIE/ICP power=20 W/1500 W, SF6 flow rate = 450 sccm - Etching time = 3 s - RIE/ICP power = 50 W/2200 W. During this process, the substrate chiller is cooled down to -10 °C in order to improve the thermal evacuation. The etching rate is 5.5 $\mu\text{m}/\text{min}$ and the etching depth is 150 μm for the bottom microfluidic circuit. After this etching step, a thin layer of ‘Teflon’ like coating is deposited on the surface of the silicon substrate using a C4F8 plasma to make easier the peeling of PDMS. The liquid mixture containing the precursor and the curing agent (10:1(v/v)) is poured on the silicon mold and polymerized on furnace at 70°C during 2 hours. It conforms to the shape of the mold. The resulting micro-structured elastomer is peeled off by hand.

A second layer of PDMS is performed using the same protocol and punched to make a hole of 8mm of diameter. The microfluidic circuit, the polycarbonate membrane and the punched PDMS layer, compose the assembly of the PDMS device. We perform the sealing in two-steps. The first step consists to bond the polycarbonate membrane to the punched PDMS layer. The PDMS layer and PC membrane are washed with isopropyl alcohol (IPA) and deionized water (DI) and dried with compressed air. 5%v/v aqueous APTES solution was made by mixing APTES (99%) reagent with EDI and heated at 80°C. The porous membrane was activated by corona treatment then immersed in the APTES solution for 20 min. Using the sandwich technique, the membrane and the activated PDMS were brought into contact and subsequently pressed together. The next step consists to seal the sandwich PDMS/PC to the PDMS microfluidic part by corona and placed in contact directly. The total structure is placed in furnace at 90°C to improve adhesion between layers.

The microfluidic device is composed of two parts. The top part composed of a hole of 7.5mm of diameter to place the explant and the bottom part composed by a microfluidic circuit to perfuse the culture medium. These two parts are separated by micro-porous polycarbonate membrane with pores of 0.4 μm .

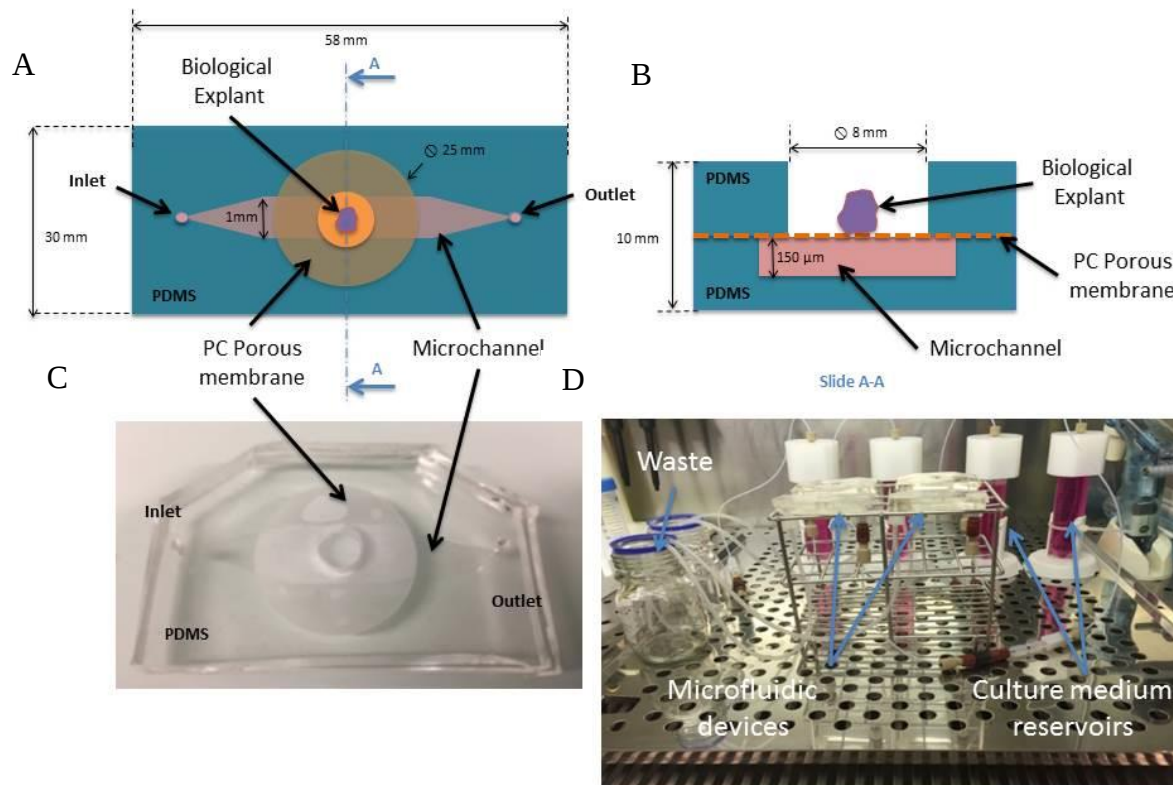


Figure 14 The microfluidic device used for explant culture : (A) Design and dimensions of the microfluidic device. (B) A polycarbonate membrane was bounded to a PDMS sandwich. The PDMS was perfused to form a culture chamber. (C) Four microfluidic devices were connected to the medium culture through microchannels of 1 μm diameter. (D) The microchannels were connected to a pressure pump regulated by the Fluigent program .

Animals

The animals were kept in aseptic conditions in an isolator and were regularly inspected to assess microbial and parasitological infections (including *Helicobacter* spp.). Three SCID mice were administered 4 mg/L of dexamethasone sodium phosphate (Dex) (Merck, Lyon, France) *via* drinking water as previously described [6] two weeks before euthanasia by carbon dioxide inhalation for

tissue culture experiments. Experiments were conducted in the animal facility (PLETHA Pasteur) at the “Institut Pasteur de Lille” (research accreditation number A59107). The animal protocols were approved by the French regional ethics committee (approval number CEEA 112011).

Colon explant preparation

The tissue was prepared as previously described by Bareiss et al. with some modifications[7]. The colon recovered from the animals was dissected and cleaned of fecal contents with cold Hank's Balanced Salt Solution supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and metronidazole (50 µg/mL). The tissue was opened along its length and cut into 8 mm² pieces. The explants were then transferred into the device. The medium culture distributed by the microfluidic device was prepared as following: 1 mL medium consisting of HEPES buffered DMEM/F12, 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), L-glutamine (2 mM), insulin/transferrin/selenite mix (1:100), Albumax (1 mg/mL), hydrocortisone (1 µM), glucagon (14.3 nM), 3,3',5'-triiodo-L-thyronine (1 nM), ascorbate-2-phosphate (200 µM), linoleic acid (20 µM), estradiol (10 nM) and keratinocyte growth factor (KGF) (50 ng/mL). 9 threedimensional tissue samples of adult SCID mouse colon were cultured using the microfluidic device for up to 8 days. Three explants were put in each chamber. Mouse colonic sections obtained immediately after dissection were used as controls for histology characterization.

Histological analysis

The cultured explants were stopped after 8 days of culture and then fixed in 10% formalin, and embedded in paraffin. Sections of 5 µm were stained with Hematoxylin Eosin Safranin (Leica Autostainer-XL, Rueil-Malmaison, France) or deparaffinized, rehydrated through serial dilution of alcohol and washed in PBS (pH 7.2) for histological analysis. Sections stained with Hematoxyline, Eosine and Safranine were examined using a Leica DMRB microscope equipped with a Leica digital camera connected to an Imaging Research MCID analysis system (MCID software, Cambridge, United Kingdom).

Results

Device Characterization

A calibration of this device in terms of flow rate versus pressure has been establish (Figure 2) with Di water. The performance of the pressure pump was first characterized, and the relationship between the volume flow rate and the applied pressure was shown in figure 2. The volume flow rate

increased with the applied pressure at the inlet of the microfluidic system. The microfluidic system was able to support high pressure (100mb) while keeping the medium flowing from the inlet to the outlet without filling the culture chamber.

Histological characterization

3 explants out of 9 presented a preserved histological organization characterized by a basal lamina covered by a prismatic epithelium with nuclei in basal position, and connective tissue showing collagen, fibroblasts, and smooth muscle (Figure. 3 B and C) when compared to controls (Figure A). The crypts are parallel to each other and perpendicular to the muscularis mucosa (Figure 3B and C). 4 explant tissues presented signs of suffering. In fact, the quality of epithelial cells decreased and denser collagen fibers were detected in the sections (Figure 3C). On the contrary, 2 the tissues showed sign of necrosis with a loss of all the epithelial cells (Figure 3D).

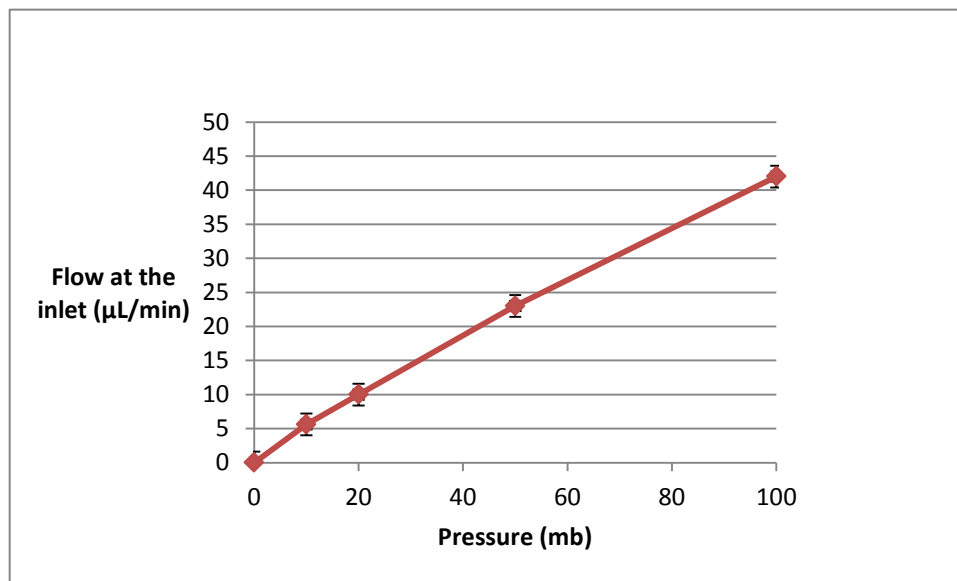


Figure 15 The relationship between the different applied pressures of the pump and the volume flow rate. Values of consecutive experiments on the four different devices prepared.

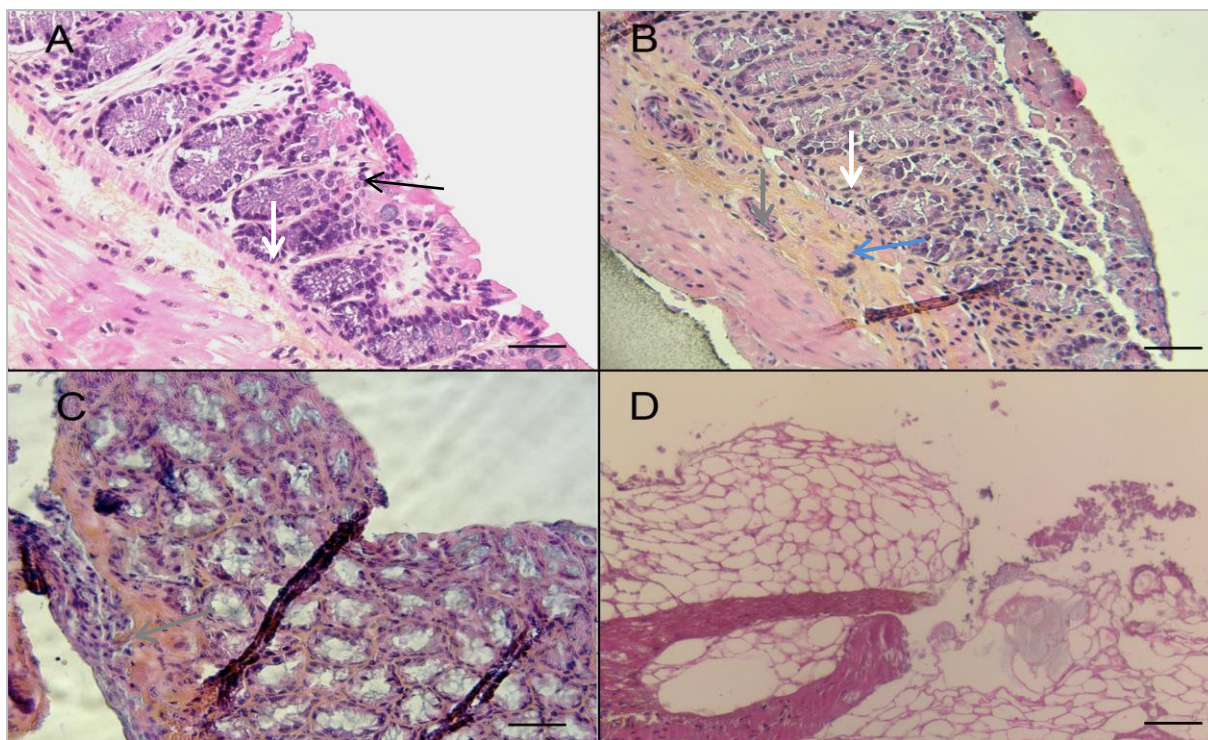


Figure 16 Histological validation of the murine colonic explant in a microfluidic culture system. (A) Normal non cultivated colon section of SCID mice stained with Hematoxylin Eosin Safranin (HES). This control is healthy and shows a normal architecture with a characteristic prismatic epithelium (black arrow), a basal lamina (white arrow). Scale bar, 40 μ m. (B) Colonic explant section stained with HES after 8 days of culture showing glands of normal size and a normal tissue structure with a characteristic collagen fibers (grey arrow), a preserved basal lamina (white arrow) and a muscularis mucosa (blue arrow). (C) HES staining of a colonic explant section after 8 days of culture showing signs of suffering with collagen fibers becoming more thicker (grey arrow) (D) HES staining of a colonic explant section after 8 days of culture showing a complete necrosis. No epithelial cells were detected. Scale bars, 20 μ m

Discussion

In the present study, we performed an explant tissue culture of the gut using a microfluidic device and for the first time the gut explant was viable in culture during 8 days. Even if this viability is shorter compared to standard explant cultures [7, 8] previous studies combining 3D tissue gut cultures and microfluidics reported a maximal viability of 24 hours. For instance, [9] a microfluidic device with inputs where the gut was fixed with a surgical thread was developed. This input was used to distribute the molecules or microbes into the lumen. The output was responsible of maintaining the continuous renewal of medium culture. This system supported the culture for only 2 days. An alternative of this type of culture is the development of gut-on-chip. Previous work [10, 11], succeeded in recapitulating the gut epithelium by cultivating the Caucasian colon adenocarcinoma (Caco-2) cell line. Even though the culture was viable for at least one week, the system was based on the use of transformed cells whereas our system uses the colon of SCID mice. Another type of cancer cells that is commonly use are the Human colon acarcinoma (HCT-8) cell line ([12, 13]. Although these systems assumed important strategies in studying physiological processes, they depended on transformed cells. In fact, transformed cells have shown to exhibit

different growth characteristics comparing to non-transformed cells [14]. Nowadays, there is a compelling need for an organ culture system capable of preserving the integrity of the tissue in order to recapitulate the complex physiological interaction between cells. Our microfluidic system includes fluidic inlets and outlets, a culture chamber and transport channels. To our knowledge, few similar experiments have been developed. Nevertheless, 3D culture using microfluidic techniques have mostly been performed on organoids, co-culture of different types of cells and cancer models [15]. Comparing this system developed herein to what has been published before two similarities were noticed between them: the use of PDMS and the polycarbonate membrane. PDMS is commonly used for this type of device [16]. Indeed, PDMS remains the most used material for making microfluidic devices in few hours. This is due mainly to PDMS biocompatibility [17], permeability to air [18] and easy handling to fabricate using simple plasma or corona treatment [19]. Despite all the beneficial properties of the PDMS, the main drawback is that PDMS could absorb small hydrophobic molecules from the medium culture that are necessary for the culture viability. Another problem is that the permeability of PDMS, favors the vaporization of the medium contained in the channel [20]. Regarding the use of the polycarbonate membrane, this was motivated by the fact that the membrane was porous and more importantly, the membrane supported the APTES treatment and was effectively bound to PDMS [21]. However, the choice of the membrane could have played a role in preventing a longer viability of the explant. In fact, traditional 3D culture systems used the nitrocellulose membrane as a scaffold for tissue culture [7, 22]. In our study this type of membrane could not bond to PDMS without media leaking in the chamber culture. The leaking would result in submerging the explant in the medium culture. On the contrary, it has been reported that maintaining the explant at the interface air-medium is crucial for a longer period of culture [8]. Finally, the pressure box used laboratory air to insure a medium flow, hence inducing the change in the pH of the medium culture. This could be problematic for the culture that should be maintained in anaerobic conditions. Furthermore, the medium culture was supplemented with SBF that is believed to enhance the epithelial restitution upon culture [23, 24]. No bacterial presence was detected in the medium culture suggesting that this device maintained sterile conditions and hence it can be used for other biological questions.

Conclusion

The majority of microfluidics models of human intestinal culture rely either on culturing an intestinal epithelial cell monolayer or on organoid culture. Regardless of the importance of this type of culture it remains limited when it comes to the *in vivo* microenvironment. The importance of the device developed herein relies, in fact, on the respect of this highly complex microenvironment. We believe

that the device developed herein should be improved to allow pursuing the culture in time. Furthermore, this device could be enhanced with life imaging to acquire time lapse video leading to study biological responses. In conclusion, our device represents a brand new tool opening access to colonic pathology induced by infective agents (such as bacteria, virus, fungus or protozoa), or for colonic cancer research.

References

1. Sackmann EK, Fulton AL, Beebe DJ. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature*. 2014;507:181–9.
2. Li X (James), Valadez AV, Zuo P, Nie Z. Microfluidic 3D cell culture: potential application for tissue-based bioassays. *Bioanalysis*. 2012;4:1509–25.
3. van Duinen V, Trietsch SJ, Joore J, Vulto P, Hankemeier T. Microfluidic 3D cell culture: from tools to tissue models. *Curr Opin Biotechnol*. 2015;35 Supplement C:118–26.
4. Sip CG, Bhattacharjee N, Folch A. Microfluidic transwell inserts for generation of tissue culture-friendly gradients in well plates. *Lab Chip*. 2014;14:302–14.
5. Dosh RH, Jordan-Mahy N, Sammon C, Le Maitre C. Tissue Engineering Laboratory Models of the Small Intestine. *Tissue Eng Part B Rev*. 2017.
6. Certad G, Ngouanesavanh T, Guyot K, Gantois N, Chassat T, Mouray A, et al. *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma. *Infect Agent Cancer*. 2007;2:22.
7. Bareiss PM, Metzger M, Sohn K, Rupp S, Frick JS, Autenrieth IB, et al. Organotypical tissue cultures from adult murine colon as an in vitro model of intestinal mucosa. *Histochem Cell Biol*. 2008;129:795–804.
8. Costa MO, Harding JCS, Hill JE. Development and evaluation of a porcine in vitro colon organ culture technique. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2016;52:942–52.
9. Yissachar N, Zhou Y, Ung L, Lai NY, Mohan JF, Ehrlicher A, et al. An Intestinal Organ Culture System Uncovers a Role for the Nervous System in Microbe-Immune Crosstalk. *Cell*. 2017;168:1135–1148.e12.
10. Kim Y, Joshi SD, Messner WC, LeDuc PR, Davidson LA. Detection of Dynamic Spatiotemporal Response to Periodic Chemical Stimulation in a *Xenopus* Embryonic Tissue. *PLoS ONE*. 2011;6. doi:10.1371/journal.pone.0014624.
11. Kim HJ, Li H, Collins JJ, Ingber DE. Contributions of microbiome and mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human gut-on-a-chip. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:E7–15.
12. Che Y-J, Wu H-W, Hung L-Y, Liu C-A, Chang H-Y, Wang K, et al. An integrated microfluidic system for screening of phage-displayed peptides specific to colon cancer cells and colon cancer stem cells. *Biomicrofluidics*. 2015;9. doi:10.1063/1.4933067.

13. Betz JF, Cheng Y, Tsao C-Y, Zargar A, Wu H-C, Luo X, et al. Optically clear alginate hydrogels for spatially controlled cell entrapment and culture at microfluidic electrode surfaces. *Lab Chip*. 2013;13:1854–8.
14. Cell Cycle Control, Oncogenes, Tumor Suppressors | Learn Science at Scitable. <http://www.nature.com/insb.bib.cnrs.fr/scitable/topicpage/cell-cycle-control-by-oncogenes-and-tumor-14191459>.
15. Wikswo JP, Curtis EL, Eagleton ZE, Evans BC, Kole A, Hofmeister LH, et al. Scaling and systems biology for integrating multiple organs-on-a-chip. *Lab Chip*. 2013;13:3496–511.
16. Miura T, Yokokawa R. Tissue culture on a chip: Developmental biology applications of self-organized capillary networks in microfluidic devices. *Dev Growth Differ*. 2016;58:505–15.
17. Li Q, Sun L, Zhang L, Xu Z, Kang Y, Xue P. Polydopamine-collagen complex to enhance the biocompatibility of polydimethylsiloxane substrates for sustaining long-term culture of L929 fibroblasts and tendon stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2017.
18. Firpo G, Angeli E, Repetto L, Valbusa U. Permeability thickness dependence of polydimethylsiloxane (PDMS) membranes. *J Membr Sci*. 2015;481:1–8.
19. Lycans RM, Day BS, Higgins CB, Blough ER, Tanner MS. Plasma treatment of PDMS for applications of in vitro motility assays. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201700121560>. Accessed 2 Dec 2017.
20. Markov DA, Lillie EM, Garbett SP, McCawley LJ. Variation in diffusion of gases through PDMS due to plasma surface treatment and storage conditions. *Biomed Microdevices*. 2014;16:91–6.
21. Chueh B, Huh D, Kyrtos CR, Houssin T, Futai N, Takayama S. Leakage-Free Bonding of Porous Membranes into Layered Microfluidic Array Systems. *Anal Chem*. 2007;79:3504–8.
22. Metzger M, Bareiss PM, Nikolov I, Skutella T, Just L. Three-dimensional slice cultures from murine fetal gut for investigations of the enteric nervous system. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat*. 2007;236:128–33.
23. Defries EA, Franks LM. An organ culture method for adult colon from germfree and conventional mice: effects of donor age and carcinogen treatment on epithelial mitotic activity. *J Natl Cancer Inst*. 1977;58:1323–8.
24. Werner S. Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1998;9:153–65.

VII. Discussion

Axe1: Etude du rôle de *Cryptosporidium* dans le développement de cancer digestif chez l'Homme.

Le cancer colorectal est une cause importante de morbidité et de mortalité dans le monde. Globalement, c'est le quatrième cancer le plus fréquent chez l'homme et le troisième chez les femmes (World Cancer Research Fund International). En outre, le cancer colorectal a été identifié comme un des cancers non définis par le SIDA (non-AIDS defining malignancies) avec une incidence de plus en plus élevée chez les patients VIH+ par rapport à la population générale (Patel *et al.*, 2008). Ce cancer se développe à un âge plus précoce et d'une façon plus agressive quand les patients sont infectés par le VIH (Yegüez *et al.*, 2003). L'incidence de cancer colorectal chez les patients sidéens est 2,3 fois plus importante que dans la population générale (Patel *et al.*, 2008). Malgré les progrès de la médecine qui ont permis de mieux connaître les mécanismes de développement des cancers, les causes des cancers colorectaux ne sont pas parfaitement connues. La plupart des cancers semblent être le résultat d'un ensemble complexe de facteurs comme l'hérédité, les choix de vie ou l'exposition à des substances qui causent le cancer (appelées substances cancérigènes). Toute situation ou substance qui augmente le risque d'avoir un cancer est appelée facteur de risque. Les principaux facteurs de risque de cancer colorectal sont : l'âge, les habitudes de vie, la présence de polypes, les antécédents personnels de cancers, les antécédents familiaux de cancers colorectaux, les maladies inflammatoires du côlon, les mutations prédisposant au risque de cancer colorectal à savoir la polypose adénomateuse familiale (PAF) et le syndrome de Lynch (Institut National du Cancer, 2009). Les infections n'ont pas été proposées comme causes directes de cancer colorectal mais la capacité de *C. parvum* à induire la formation de néoplasies digestives chez la souris SCID traitée par la dexaméthasone et infectée par *C. parvum* a été mise en évidence au moins dans un modèle expérimental (Benamrouz *et al.*, 2014, 2012b, Certad *et al.*, 2010c, 2007b). Le récent développement d'un modèle murin d'infection par *Cryptosporidium* a permis une avancée majeure dans la démonstration du potentiel cancérigène de l'infection par ce parasite. De manière surprenante, des souris développent précocement des adénocarcinomes du tractus digestif après infection par diverses souches de *C. parvum*, quelle que soit la quantité de parasites inoculée. Cependant, *C. muris*, une espèce au tropisme murin ne contribue pas au développement néoplasique (Cheeseman *et al.*, 2016).

Chez l'Homme, les données sur cette association entre *Cryptosporidium* et cancer sont rares mais ont cependant été évoquées à plusieurs reprises. Sur la base de preuves cliniques et épidémiologiques, de

nombreux rapports ont souligné une association potentielle entre des infections par des protozoaires parasites et le cancer.

De ce fait, le premier axe de ma thèse a eu comme objectif de déterminer la fréquence de *Cryptosporidium* chez les patients atteints de cancers digestifs grâce à l'exploration moléculaire de la présence du parasite dans des biopsies.

Nous avons réalisé une étude visant à rechercher la présence du parasite dans des biopsies digestives incluses en paraffine de patients atteints ou non de cancer dans la région Nord-Liban (Article 2) où une forte prévalence de cryptosporidiose dans différentes cohortes de la population a été mise en évidence précédemment (Osman *et al.*, 2015, 2016). Trois populations ont été ciblées pour cette étude : (i) des patients libanais avec des néoplasies coliques, récemment diagnostiqués et n'ayant subi aucun traitement, et deux populations témoin (ii) des patients libanais avec des néoplasies gastriques, récemment diagnostiqués et n'ayant subi aucun traitement et (iii) des patients présentant des symptômes digestifs persistants justifiant la réalisation d'une biopsie. Nous avons pu montrer une forte prévalence de *Cryptosporidium* (17%) chez des adultes Libanais, atteints de néoplasies digestives récemment diagnostiquées et avant tout traitement. Cette prévalence a été encore plus importante (22%) chez les patients atteints de cancer colorectal. Cependant, dans la population témoin la prévalence de *Cryptosporidium* a été de 5%. Cette prévalence est comparable à celle observée dans la population libanaise (Osman *et al.*, 2015, 2016). Des analyses histologiques et par immunofluorescence ont permis la confirmation de la présence de différents stades évolutifs du parasite au niveau de lésions néoplasiques (Article 2, figure 2)

Afin d'exclure la présence d'autres agents pathogènes oncogènes comme l'Epstein Barr Virus (EBV), connu pour son pouvoir oncogène (Yao *et al.*, 2017) une recherche a été réalisée afin d'évaluer la présence de ce virus dans les échantillons analysés. Une répartition homogène de l'EBV a été retrouvée dans les deux groupes infectés ou non par *Cryptosporidium* ainsi que dans les deux populations étudiées avec et sans néoplasies digestives. Nos résultats sont concordants avec d'autres études montrant que 95% de la population pouvait être séropositive pour l'EBV et que l'infection pouvait toutefois demeurer silencieuse et asymptomatique (Ali *et al.*, 2015). Cependant, des études supplémentaires sur un plus grand nombre d'échantillons sont nécessaires pour valider cette conclusion.

Après l'analyse des données moléculaires, deux espèces de *Cryptosporidium* ont été trouvées: *C. parvum* (20,8%) et *C. hominis* (79,2%) avec une prédominance de *C. hominis*. Ces résultats sont en cohérence avec de nombreuses études qui ont montré que ces deux espèces étaient responsables de la

majorité des cas de cryptosporidiose chez l'Homme (Ryan *et al.*, 2014). Cependant, en ce qui concerne le développement des néoplasies, à ce jour le pouvoir carcinogène de *C. parvum* a pu être mis en évidence chez le modèle souris SCID car le modèle n'a pas été sensible à *C. hominis*, espèce inféodée à l'Homme (Certad *et al.*, 2007b). Cette étude a donc permis de rapporter, pour la première fois, un lien entre le cancer digestif et l'infection par *C. hominis*.

L'association entre la présence de *Cryptosporidium* et le cancer digestif chez l'Homme a été décrite à plusieurs reprises. En Espagne, il a été diagnostiqué un adénocarcinome du colon suspecté d'être lié à une cryptosporidiose, chez une patiente souffrant de diarrhée chronique (Hayward *et al.*, 1997; Izquierdo *et al.*, 1988; Patel *et al.*, 2008; Shebl *et al.*, 2012; Sulzyc-Bielicka *et al.*, 2007; Sulzyc-Bielicka *et al.*, 2012; Tomizawa *et al.*, 2004). Pour un autre cas d'adénocarcinome du côlon associé à une cryptosporidiose chez un patient sidéen souffrant de diarrhée chronique, un rôle éventuel de *Cryptosporidium* dans le développement de l'adénocarcinome a aussi été suggéré (López-Vélez *et al.*, 1995). Un cas de cryptosporidiose du tractus biliaire présentant les mêmes signes cliniques et symptômes qu'une néoplasie de la tête du pancréas a également été rapporté chez une patiente atteinte du VIH au Brésil (Souza *et al.*, 2004). De plus, *C. parvum* semble causer chez les patients atteints du syndrome d'Hyper-IgM lié à l'X (XHIM) des diarrhées continues associées à des cirrhoses et des cancers du foie (Hayward *et al.*, 1997; Tomizawa *et al.*, 2004).

Plus récemment, deux études cliniques ont été réalisées en Pologne chez des patients pour lesquels un cancer colorectal avait été diagnostiqué mais n'ayant pas reçu préalablement de chimiothérapie. La première étude, menée en 2007 sur 55 patients, a établi une prévalence de 18% de l'infection par *Cryptosporidium* spp (Sulzyc-Bielicka *et al.*, 2007). La seconde étude, réalisée en 2012 sur 87 patients, a permis d'établir une prévalence de 12,6% (Sulzyc-Bielicka *et al.*, 2012). Malheureusement, la prévalence du parasitisme par *Cryptosporidium* dans une population témoin n'a pas été connue. Enfin, une analyse épidémiologique rétrospective réalisée aux Etats Unis et publiée dernièrement, évalue, dans une population de personnes atteintes du SIDA, le risque de cancer colorectal et son association à des infections. Les auteurs ont pour cela, croisé les informations obtenues à partir de bases de données de 16 états et ont conclu que la cryptosporidiose augmente significativement le risque d'apparition d'un cancer colorectal (Shebl *et al.*, 2012).

Néanmoins, il reste difficile de comprendre si *Cryptosporidium* agit comme un oncogène favorisant le développement du cancer ou comme un agent opportuniste dont le développement a été favorisé par l'état immunosuppresseur de l'hôte. Cependant, l'identification d'agents pathogènes susceptibles d'induire des processus de transformation néoplasiques est l'un des aspects clé dans la lutte contre le

cancer. L'OMS admet aujourd'hui que 20% des cancers chez l'Homme sont dus à des agents infectieux.

En conclusion, dans le premier axe de ma thèse, les premières données épidémiologiques associant la présence de *Cryptosporidium* au niveau du tissu épithélial et le cancer digestif ont été fournies. L'ensemble des données expérimentales chez l'animal et clinico-épidémiologiques chez l'Homme suggère fortement que le spectre de pathogénicité de *Cryptosporidium* comporte un pouvoir carcinogène qui s'exprime dans le tractus gastrointestinal de mammifères immunodéprimés et probablement l'Homme. Si les données épidémiologiques et les expériences *in vivo* valident l'association *C. parvum*/cancer, le développement de modèle de culture *in vitro* est crucial pour apporter un outil permettant l'exploration des mécanismes associés à la pathogénicité du parasite et pour reproduire de façon fiable ces résultats. Ceci fut l'objectif de mon deuxième objectif de thèse.

Axe 2: Le développement d'un système de culture 3D pour l'étude de la cryptosporidiose.

Les premiers travaux expérimentaux montrant le potentiel cancérigène de l'infection par *Cryptosporidium* se heurtent au modèle animal qui est complexe, coûteux et qui soulève toujours des questionnements éthiques. De plus, il nécessite l'emploi de nombreux animaux et ne permet pas de façon simple l'étude de la progression de la lésion et des voies de cancérogenèse. Une approche *in vitro* permettrait de faciliter la compréhension fine des mécanismes de pathogénicité et particulièrement de l'oncogenèse en simplifiant le modèle biologique d'étude. D'autre part, dans les systèmes de culture *in vitro*, la manipulation des échantillons est plus simple. Par exemple, il est plus facile d'inhiber par la technique d'ARN interférence l'expression d'un gène que d'établir des modèles animaux génétiquement modifiés (Perrimon *et al.*, 2010). Cependant, l'exploration des mécanismes impliqués dans le processus de cancérisation induit par *Cryptosporidium* est rendu difficile par un manque de méthodes de culture *in vitro* permettant la multiplication de *Cryptosporidium* en continu tout en maintenant l'intégrité de la cellule hôte et de son environnement. Bien que de nombreux progrès aient été réalisés dans le développement des systèmes de culture pour *Cryptosporidium*, la compréhension du pouvoir pathogène de ce parasite demeure, néanmoins problématique. Nous avons discuté dans l'article 1 les différents progrès techniques pour la culture de *Cryptosporidium* et deux conclusions majeures ont été retenues de ce travail bibliographique :

- Il existe à l'heure actuelle une incapacité à cultiver *Cryptosporidium* pour de longues périodes et dans des dispositifs facilement utilisables.

- L'utilisation de cellules cancéreuses ou transformées pour la culture de *Cryptosporidium* est encore la méthode la plus répandue.

Dans ce contexte, nous avons décidé, de développer un nouvel outil pour l'étude de la cryptosporidiose basé sur un modèle de culture 3D à partir d'explants entériques murins, dans le but de s'affranchir de ces deux problèmes et de permettre une culture en continu de *C. parvum* dans un microenvironnement capable de reproduire les conditions *in vivo*. Ainsi, nous avons décidé de cultiver des explants entériques pour le suivi cinétique de l'infection par *C. parvum* (Article 3). En effet, il existe beaucoup de différences entre la culture 2D et 3D, la plus importante étant l'interaction des cellules avec leur microenvironnement. La nécessité d'élaborer des modèles de culture 3D émane du besoin de reproduire la complexité des interactions cellulaires qui jouent un rôle pilote dans les fonctions des tissus *in vivo*. Pour cela, le deuxième axe de ma thèse a été divisé en deux sous parties. Une première phase de travail a consisté en une optimisation des conditions de culture de l'explant de l'intestin provenant de la souris. Suite à cette étape, les explants ont été infestés par des sporozoïtes de *C. parvum*. Pour ce faire, des explants (morceaux de 12mm² de colon de souris SCID-D) non infectés par le parasite ont d'abord été mis en culture afin de tester différents paramètres comme la composition du milieu et le type de support. Le maintien de l'intégrité de l'explant a été vérifié périodiquement aux moyens de méthodes histologiques et biochimiques ce qui a permis de définir les meilleures conditions de culture. Par la suite, un second test a été réalisé en additionnant, après huit jours de culture, une étape d'infection par *Cryptosporidium*.

L'explant a été positionné sur une membrane millipore, à l'interface air-milieu. Cette technique a déjà été utilisée (Bareiss *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2016; Metzger *et al.*, 2007). En effet, cette position assure une bonne oxygénation et une distribution appropriée des nutriments contenus dans le milieu de culture. Un facteur clé dans ce type de culture est le support utilisé. En effet, nous utilisons des membranes millipores de 0,45 µm, ce même type de membrane a été utilisé par Bareiss *et al* et Metzger *et al* mais avec un diamètre faiblement différent. En comparant notre technique à celle déjà décrite, nous remarquons que la différence la plus importante est dans le type de sérum utilisé. Nous avons utilisé le sérum de veau fœtal alors que Bareiss *et al* et Metzger *et al.* ont utilisé le sérum de cheval. Le milieu de culture a été aussi supplémenté par le facteur de croissance KGF favorisant alors la régénération des cellules épithéliales (Werner, 1998). Cette technique de culture a permis de maintenir l'explant vivant pendant 35 jours avec une conservation de l'architecture de l'épithélium : un épithélium prismatique avec une lame basale et un tissu sous-jacent présentant des caractéristiques d'un tissu conjonctif, adipeux et musculaire a été observé (Article 3, Figure 1). Tout au long de la culture, les cellules épithéliales continuaient à proliférer comme le montre le marquage

Ki67 (Article 3, Figure 2) De plus, la LDH a gardé une valeur constante (Article 3, Figure 3) suggérant alors l'absence de cytotoxicité cellulaire. L'ensemble de ces observations permet de conclure que l'explant a été maintenu au moins 35 jours en culture avec une bonne viabilité. D'autres facteurs contribuant à l'amélioration de la viabilité des explants en culture ont également été évoqués. Par exemple, Labruyère *et al.*, et Gustafsson *et al.* 2012, ont enlevé le tissu musculaire des explants en culture afin d'empêcher la contraction du tissu (Bansal *et al.*, 2009; Gustafsson *et al.*, 2012). Il faut signaler que dans ces travaux, les chercheurs ont mis en culture des explants humains pendant une très courte période de temps (≤ 60 heures). En revanche, nous avons estimé qu'enlever le tissu musculaire de l'épithélium pouvait engendrer un stress supplémentaire au tissu, l'empêchant par la suite de rester viable pour une longue période de temps. De façon intéressante, le support que nous avons utilisé et le milieu de culture étaient différents. D'autre part, nous avons utilisé des explants provenant des intestins de souris SCID traitées à la dexaméthasone. De travaux précédents ont montré que le système immunitaire peut avoir un rôle dans la réorganisation de l'architecture de l'épithélium (Evans *et al.*, 1992) et que la modulation de l'immunité peut avoir des conséquences sur le cytosquelette de l'épithélium intestinal (Solaymani-Mohammadi and Singer, 2013). Le statut immunodéprimé des souris utilisées a pu donc favoriser la survie de l'explant pendant 35 jours.

Dans un deuxième temps nous avons voulu valider l'utilisation de ce système de culture pour étudier l'infection par *Cryptosporidium*. Pour ce faire, l'explant a été infecté au bout de 8 jours de culture par deux doses différentes d'oocystes désenkystés contenant 25 et 250 sporozoïtes. De façon intéressante, l'explant a été sensible aux deux doses utilisées. Cependant, le système a été plus sensible à l'infection par introduction de 25 oocystes désenkystés comme le montre l'augmentation significative de la quantité génomique de *C. parvum* dans le milieu de culture (Article 3, Figure 5). En effet, de résultats similaires ont été déjà rapportés lorsque des souris ont été infectées avec une faible dose de *C. parvum* (Benamrouz *et al.*, 2012b) où 45 jours après infection, 10 000 oocystes par gramme de matière fécale ont été retrouvés. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus lorsque des explants de la trachée de l'embryon de poulet ont été infectés par *C. baileyi* (Zhang *et al.*, 2012).

L'approche de culture d'explant a été préalablement utilisée pour étudier l'expression des gènes après infection par *C. parvum*. Pour cela, les tissus de la région iléale d'individus subissant une chirurgie pour une cause non infectieuse, ont été prélevés et préparés pour être infectés par *C. parvum* (Castellanos-Gonzalez *et al.*, 2008). Les auteurs ont montré que très peu de cellules ont été infectées par le parasite. Ces données sont en concordance avec nos observations histologiques qui ont montré que seulement quelques cellules ont été infectées par *C. parvum*.

Dans le but de valider l'obtention de l'ensemble du cycle de vie de *C. parvum* dans notre système de culture, nous avons marqué les éléments présents dans le milieu cellulaire (récupéré après 22 jours de culture) avec l'anticorps anti-*Cryptosporidium* lié à un fluorochrome (FITC). Cette analyse nous a permis de visualiser des oocystes (Article 3, figure 4). Nous estimons que ces oocystes sont effectivement le résultat d'un cycle complet de *C. parvum* dans le système de culture avec une phase asexuée et une phase sexuée, étant donné que les explants ont été infectés par des oocystes désenkystés et que le milieu de culture utilisé pour le marquage a été récupéré après deux changements du milieu. Il demeure toutefois la question du pouvoir infectieux des oocystes ainsi obtenus. Ainsi pour compléter nos résultats, il serait particulièrement intéressant de tester la capacité des oocystes produits dans ce système de culture à infecter le modèle animal. Une évaluation de l'augmentation de la quantité d'ADN génomique de *C. parvum* dans les tissus serait également utile.

Quelques systèmes de culture 3D pour l'infection à *Cryptosporidium* ont été déjà décrits. Nous citons à cet égard les travaux de Castellanos Gonzalez *et al* (Castellanos-Gonzalez *et al.*, 2013). Les auteurs ont mis en culture des cryptes d'intestins humains pendant 60 jours. Après infection, les cryptes sont restées viables pendant 120 heures. Dans notre système, l'infection a été maintenue 27 jours. D'autre part, des cellules HCT-8 ont été utilisées en combinaison avec la technologie de « Hollow-fiber ». Cette technique intéressante est basée sur un système de culture permettant de créer deux environnements : un espace passant sous les cellules pour les alimenter en milieu de culture oxygéné et un espace passant au-dessus des cellules permettant la circulation d'un milieu dépourvu d'oxygène similaire à l'intestin (Morada *et al.*, 2016). Cette technique a permis une production importante de parasites. Cependant, la « hollow-fiber » technologie ne peut pas être utilisée pour l'étude de l'interaction hôte–pathogène, vu que les cellules cancéreuses sont cultivées dans un dispositif ne permettant pas de visualiser les cellules. Les cellules cancéreuses Caco-2 ont été également cultivées pour essayer de reproduire un système tridimensionnel d'intestin humain (Chen *et al.*, 2015). Bien que ce système supporte l'infection pendant 15 jours et présente tous les avantages d'une culture 3D, il nécessite néanmoins l'utilisation des cellules cancéreuses qui par voie de conséquence ne permettent pas d'appréhender les étapes d'induction cancéreuse liées au parasite.

Nous avons ainsi pu montrer que les explants infectés maintenaient une structure histologique normale durant au moins 27 jours (durée du suivi) dans les conditions sélectionnées. Suite à l'infestation, le parasite était présent aussi bien dans le tissu que dans le milieu. De plus, la quantification du parasite dans les milieux de culture a mis en évidence une augmentation (de l'ordre de 5 fois) de sa quantité après 22 jours d'infection, preuve de sa multiplication *in vitro*.

Cryptosporidium fait partie des 10 thèmes prioritaires de l'association « Bill and Melinda GATES » (BMGF). Cette association finance la recherche de traitement contre la cryptosporidiose chez l'enfant, et soutient les nouvelles technologies permettant « d'accélérer le développement des approches largement applicables qui peuvent être utilisées pour favoriser le développement d'interventions thérapeutiques » (BMGF home page). Le système de culture développé durant ma thèse propose un système simple, facile et reproductible pour la culture de ce parasite. Ce système est d'un grand intérêt dans la mesure où il pourra être utilisé pour le développement de thérapies contre la cryptosporidiose.

C'est la première fois qu'une méthode de culture continue de *Cryptosporidium* sur explant a pu être développée avec succès en maintenant l'intégrité du tissu. Ce système facilitera grandement l'étude des interactions entre le parasite et son hôte dont l'exploration des processus précoces de cancérogénèse induit par *Cryptosporidium*. Mais plus important encore, nous avons réussi à mettre en évidence le développement d'une néoplasie intraépithéliale de bas grade après 27 jours d'infection. Il s'agit du premier modèle de culture permettant le développement de néoplasies épithéliales après une infection parasitaire. Ce résultat met aussi l'accent sur la cinétique extrêmement rapide de l'induction cancéreuse par les parasites du genre *Cryptosporidium* dans le modèle de souris SCID.

Si le premier axe de ma thèse présente des données épidémiologiques en faveur de l'association entre l'infection à *C. parvum* et le développement du cancer colorectal, le système de culture, quant à lui, a permis de mettre en évidence le développement de néoplasie de bas grade *in vitro* après infection par *C. parvum*. D'autres études sont nécessaires pour comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables du développement de cette néoplasie. En conclusion, ce système nous a permis de suivre la cinétique de l'infection par *C. parvum* et de mieux discerner son pouvoir cancérigène.

Axe 3: Développement d'un dispositif microfluidique pour la culture d'explants entériques.

Nous avons discuté dans les chapitres précédents de la nécessité d'étudier les mécanismes biologiques normaux et anormaux dans un modèle qui reproduit le microenvironnement de l'*in vivo*. Afin de mettre en place une plateforme prometteuse d'automatisation dans des conditions de cultures extrêmement contrôlées, nous avons décidé de développer un dispositif microfluidique pour la culture d'explants (Novo *et al.*, 2013). En effet, la microfluidique offre la possibilité de développer

une plateforme expérimentale permettant de réduire le volume des consommables employés et par là, de diminuer les coûts expérimentaux tout en limitant les risques de contamination (Aziz *et al.*, 2017b). D'autre part, elle peut être utilisée pour imiter la fonction d'un organe en mettant en parallèle les tissus, leur microenvironnement et une perfusion d'éléments biochimiques (Bhatia and Ingber, 2014). Dans les dispositifs microfluidiques, le canal a une longueur inférieure à 1mm permettant alors la création de gradients chimiques ou physiques utilisés pour l'étude de la migration cellulaire (Schwarz *et al.*, 2016), la différenciation cellulaire (Cimetta *et al.*, 2010), l'intégrité des jonctions cellulaires (Ramadan and Jing, 2016). La culture 3D en microfluidique a de même un grand potentiel pour étudier les mécanismes impliqués dans les processus physiologiques des organes. Elle est particulièrement bien adaptée à l'étude des signalisations cellulaires qui dépendent majoritairement de l'architecture tissulaire et de composants (chimiques ou physiques) du microenvironnement (Velve-Casquillas *et al.*, 2010). Nous nous intéressons particulièrement aux techniques microfluidiques développées pour la culture 3D de tissus de l'intestin. En effet, la plupart des cultures 3D pour l'épithélium intestinal se concentrent sur la culture des organoïdes ou la co-culture de cellules transformées capables sous certaines conditions de développer des structures mimant les cryptes ou les villosités (Chi *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016, 2011). Peu de données sont disponibles sur la culture d'explant en système microfluidique. La plus récente consistait à relier le colon d'une part par une seringue assurant la distribution du milieu de culture et d'autre part une seringue assurant la distribution des bactéries dans la lumière de l'intestin (Yissachar *et al.*, 2017). Le colon a été maintenu vivant pendant 24 heures, alors que notre explant est viable pour une durée allant jusqu'à 8 jours. Cependant, par rapport à la durée de viabilité acquise dans la culture développée dans l'axe 2, la durée reste relativement plus faible.

Plusieurs contraintes technologiques peuvent expliquer la difficulté de maintenir au-delà de huit jours la culture de l'explant.

La première étant l'utilisation d'une membrane poreuse de polycarbonate pour la fabrication du dispositif, alors qu'une membrane de nitrocellulose a été sélectionnée dans la culture normale. En effet, la membrane de nitrocellulose est la plus utilisée pour ce type de culture (Bareiss *et al.*, 2008; Metzger *et al.*, 2007) probablement à cause des propriétés biochimiques de la membrane permettant une absorption du milieu de culture. Peu de données sont disponibles sur le rôle de la membrane millipore. Néanmoins, si on compare les résultats obtenus ici et ceux obtenus dans la culture traditionnelle, on peut discuter le rôle et l'importance de la membrane dans le maintien de la culture. Cependant, la membrane millipore n'a pas toléré le traitement à l'APTES et du coup il a été impossible de la coller au PDMS et d'empêcher la fuite du milieu de culture dans la chambre de

culture où se trouvait l'explant. En effet, cette fuite avait comme conséquence le remplissage de la chambre par le milieu de culture submergeant par la suite les explants. Cependant, il a été déjà établi qu'une position à l'interface air-milieu favorise la survie de l'explant (Costa *et al.*, 2016). D'autre part, un remplissage de la chambre de culture empêche la création d'un flux de milieu de culture allant du point d'entrée du dispositif au point de sortie.

D'autre part, nous avons utilisé le PDMS pour fabriquer le dispositif parce qu'il est biocompatible (Bélanger and Marois, 2001), perméable à l'air (Firpo *et al.*, 2015) et facile à utiliser par un simple traitement de plasma de corona (Lycans *et al.*, 2014). Néanmoins, le PDMS possède quelques inconvénients. Les plus pénalisants sont l'absorption par le PDMS des molécules importantes pour la culture et l'évaporation de ce milieu due à la porosité du PDMS. D'autre part, une culture de longue durée sur un dispositif à base de PDMS présente des risques d'interactions entre les composants chimiques du PDMS et le milieu de culture. La nature chimique du PDMS a des conséquences sur la culture de cellules ou de tissus (Toepke and Beebe, 2006).

Par ailleurs, afin d'assurer la distribution du flux dans le dispositif, nous avons eu recours à une pompe sous pression utilisant l'air du laboratoire. Bien que la culture ait été maintenue dans un incubateur à CO₂ et à 37°C, le milieu de culture lui-même a dû être oxydé et par conséquent le pH a changé. Ce changement de pH pourrait expliquer la durée limitée de vie de l'explant. En effet, ce problème de changement de pH est un facteur limitant pour la viabilité des cultures 3D en système microfluidique. Une alternative serait probablement d'utiliser l'air de l'incubateur pour assurer le flux, pour cela il faudrait mettre en place des pompes sous pressions capables de tolérer l'humidité dans l'incubateur ou de connecter leur entrée d'air avec l'intérieur de l'étuve. Une autre alternative serait d'aspirer le milieu de culture. Récemment, un dispositif dépourvu de pompe a également été créé et testé pour la culture cellulaire (Goral *et al.*, 2015). Ce dispositif est basé sur l'utilisation de différents niveaux de liquides visant à générer une pression hydrostatique au travers d'une membrane poreuse permettant l'écoulement de liquides. Les auteurs estiment que cette technique pourrait être appliquée aussi à la culture 3D. Par la suite, il sera intéressant d'adapter l'utilisation d'un dispositif équivalent pour la culture d'explant. Une fois que la viabilité du tissu dépassera les huit jours, il sera intéressant d'infecter l'explant par le parasite et de suivre l'infection.

En conclusion, le système microfluidique développé pendant ma thèse a permis la mise en culture d'un explant viable pour une durée allant jusqu'à huit jours. Cette durée est inférieure à celle de la culture en puits mais constitue une première étape vers l'automatisation de la culture d'explants d'intestins. Plusieurs améliorations peuvent être apportées à ce système. Cette approche constitue

une alternative très prometteuse à la démarche classique des organes sur puces qui consiste à créer un tissu à partir de cellules individuelles.

VIII. Conclusions et perspectives

Mon travail de thèse avait pour objectifs d'étudier la pathogénicité des parasites du genre *Cryptosporidium* et de mettre en évidence une association entre le développement d'un cancer colique chez l'Homme et l'infection par le parasite. Pour cela, un nouveau modèle de culture 3D *in vitro* de *C. parvum* a été mis au point basé sur des explants entériques murins et un dispositif microfluidique a été adapté à ce modèle dans le but de l'optimiser. Les différentes conclusions de ce travail sont les suivantes :

- 1 Une étude de l'association entre la présence de *Cryptosporidium* et la présence de néoplasies digestives a montré une prévalence significativement plus importante du parasite chez des patients libanais atteints de néoplasies digestives et plus particulièrement coliques. *C. parvum* et *C. hominis* ont été associés aux lésions néoplasiques avec une prédominance de *C. hominis*. Il s'agit de la première description suggérant une association entre *C. hominis* et le développement de cancers coliques.
- 2 Ce travail a permis la mise en place d'un système de culture 3D se basant sur des explants entériques de souris SCID-D. La confirmation de la viabilité de l'explant a été validée par la vérification de l'architecture histologique du tissu, de la prolifération cellulaire et de l'absence de cytotoxicité cellulaire. Il s'agit du premier modèle de culture 3D basé sur des explants entériques qui ont pu être maintenus viables pendant au moins 35 jours.
- 3 L'infection de l'explant au bout de 8 jours de culture par deux doses de *C. parvum* a été possible. La présence de l'infection a été confirmée par observation microscopique, approche moléculaire et immunofluorescence. L'infection par faible dose a permis une multiplication plus efficace du parasite. Il s'agit de la première description d'un modèle d'infection par *C. parvum* basé sur des explants entériques et dont l'infection a été maintenue au moins 4 semaines.
- 4 L'analyse histologique des explants infectés par *C. parvum* nous a permis de confirmer le développement de néoplasies intra-épithéliales de bas grade 27 jours après infection. Ce modèle constitue le premier modèle de culture 3D permettant de développer une néoplasie de bas grade après infection parasitaire.

- 5 Nos données chez l'homme et *in vitro* viennent à nouveau confirmer l'association de l'infection à *Cryptosporidium* au développement de cancers digestifs précédemment décrite dans le laboratoire en modèle animal.
- 6 Ce travail a permis la conception et la fabrication d'un dispositif microfluidique pour la culture d'explant entérique de souris SCID-D. Ce dispositif a été fabriqué à partir de PDMS et d'une membrane millipore. Il est alimentée par un système de pompes sous pressions mettant le milieu de culture sous pression. Le dispositif assurant un renouvellement continu et automatisé du milieu de culture, a maintenu l'explant vivant pendant 8 jours (durée de suivi). Il s'agit alors du premier dispositif microfluidique adapté à la culture d'explant entérique permettant une viabilité de 8 jours.
- 7 Cette approche de culture d'explant infecté par le parasite représente une avancée majeure non seulement dans l'étude de la cryptosporidiose ou des adénocarcinomes induits par des parasites, mais aussi, de manière plus générale, dans l'étude des pathologies affectant l'intestin. La culture d'explant sera ainsi une solution intermédiaire entre la culture cellulaire 2D basée sur des lignées immortalisées et l'approche exclusivement *in vivo* éthiquement remise en cause. Cette voie technique réduira le nombre d'animaux nécessaires aux expériences tout en maintenant une expérimentation dans un modèle 3D.

Dans le but de compléter ce travail de thèse, plusieurs voies d'explorations biologiques ou microfluidiques peuvent être empruntées à court et moyen terme :

- Détermination dans d'autres zones géographiques de l'implication potentielle de *Cryptosporidium* dans l'induction des cancers digestifs. Ainsi, une étude épidémiologique intégrant plusieurs hôpitaux au Sénégal est en train d'être mise en place par le laboratoire EcoPhY en collaboration avec Gilles Riveau (Centre de Recherche Biomédicale Espoir Pour La Santé CRB-EPLS, Sénégal et IPL). Cette étude épidémiologique a pour but de collecter les données cliniques des patients intégrés dans l'étude via un questionnaire standardisé. Une attention particulière sera aussi portée aux patients atteints d'un cancer des voies biliaires. Le statut immunitaire des patients sélectionnés sera aussi pris en compte. En parallèle, la détection et la caractérisation moléculaire du parasite sera réalisée sur différentes cohortes d'intérêt.
- Concernant la culture 3D infectée par le parasite, le milieu de culture récupéré lors de la culture de l'explant infecté par *Cryptosporidium* pourrait être utilisé pour infecter l'animal ou d'autres explants. Cette étape permettra de confirmer que le parasite a pu

réaliser son cycle de reproduction complet avec une production de nouveaux oocystes infectieux.

- La mise en place d'un système de culture 3D utilisant des explants de souris immunocompétentes pourrait aider à comprendre si la durée de vie de l'explant est due à l'état d'immunodépression de la souris ou au système de culture lui-même.
- La création d'un gradient chimique de facteur de croissance par administration temporelle de ce dernier présent dans le milieu de culture permettrait de tester la durée du maintien de la croissance cellulaire normale de l'explant.
- Ce modèle d'explant 3D infecté par le parasite pourrait être utilisé comme outil pour l'identification de voies de signalisation potentiellement impliquées dans la transformation de la cellule hôte par des approches de transcriptomique, protéomique ou épigénétique déjà développées dans l'équipe BDPEE.
- Concernant le dispositif microfluidique, l'objectif final serait de pouvoir l'adapter à la culture de *Cryptosporidium* sur explant entérique. Ce nouveau dispositif d'analyse, sur une base technologique s'appuyant sur les microsystèmes électroniques, permettrait de suivre le développement de tumeurs dans des explants d'intestin murins mis en culture et infectés par *C. parvum*. Le développement de cet outil de mesure, représentera un nouveau support technologique d'étude des cancers colorectaux. Afin de pouvoir l'optimiser, différentes pistes pourraient être envisagées :
 - Utilisation d'une pompe d'aspiration pour assurer le flux à l'intérieur du dispositif microfluidique sans risque de changement de pH.
 - Traitement de la surface du PDMS et modification de cette surface PDMS par un traitement tensioactif par exemple afin d'inhiber au maximum les effets toxiques du PDMS sur la culture de tissus.

IX. Références

- Abrahamsen, M.S., Lancto, C.A., Walcheck, B., Layton, W., and Jutila, M.A. (1997). Localization of alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes in *Cryptosporidium parvum*-infected tissues in naive and immune calves. *Infect. Immun.* 65, 2428–2433.
- ACNN, T.A.C.N.N. (2010). Laboratory-based surveillance for *Cryptosporidium* in France, 2006–2009. *Eurosurveillance* 15(33):pii=19642.
- Adams, R.B., Guerrant, R.L., Zu, S., Fang, G., and Roche, J.K. (1994). *Cryptosporidium parvum* infection of intestinal epithelium: morphologic and functional studies in an in vitro model. *J. Infect. Dis.* 169, 170–177.
- Adamu, H., Petros, B., Zhang, G., Kassa, H., Amer, S., Ye, J., Feng, Y., and Xiao, L. (2014). Distribution and clinical manifestations of *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV/AIDS patients in Ethiopia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2831.
- Agastin, S., Giang, U.-B.T., Geng, Y., DeLouise, L.A., and King, M.R. (2011). Continuously perfused microbubble array for 3D tumor spheroid model. *Biomicrofluidics* 5.
- Aguirre, S.A., Mason, P.H., and Perryman, L.E. (1994). Susceptibility of major histocompatibility complex (MHC) class I- and MHC class II-deficient mice to *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* 62, 697–699.
- Ahmadian, N., Pashaei-Asl, R., Ahmadian, M., Rahmati-Yamchi, M., Shahabi, S., and Vazini, H. (2016). Immune response of newborn BALB/c mice to *Cryptosporidium* infection. *J. Parasit. Dis. Off. Organ Indian Soc. Parasitol.* 40, 1066–1070.
- Ahn, J., Sei, Y.J., Jeon, N.L., and Kim, Y. (2017). Tumor Microenvironment on a Chip: The Progress and Future Perspective. *Bioeng. Basel Switz.* 4.
- Aldeyarbi, H.M., and Karanis, P. (2016). The fine structure of sexual stage development and sporogony of *Cryptosporidium parvum* in cell-free culture. *Parasitology* 143, 749–761.
- Ali, A.S., Al-Shraim, M., Al-Hakami, A.M., and Jones, I.M. (2015). Epstein- Barr Virus: Clinical and Epidemiological Revisits and Genetic Basis of Oncogenesis. *Open Virol. J.* 9, 7–28.
- Alicia, T.G.G., Yang, C., Wang, Z., and Nguyen, N.-T. (2016). Combinational concentration gradient confinement through stagnation flow. *Lab. Chip* 16, 368–376.
- Arrowood, M.J. (2002). In Vitro Cultivation of *Cryptosporidium* Species. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 390–400.
- Aubert, D. (2016). A new pragmatic megaclassification of life. *Médecine/Sciences* 32, 497–499.
- Aziz, A.U.R., Geng, C., Fu, M., Yu, X., Qin, K., and Liu, B. (2017a). The Role of Microfluidics for Organ on Chip Simulations. *Bioengineering* 4.

- Aziz, A.U.R., Geng, C., Fu, M., Yu, X., Qin, K., and Liu, B. (2017b). The Role of Microfluidics for Organ on Chip Simulations. *Bioeng. Basel Switz.* 4.
- Bagherifard, S., Tamayol, A., Mostafalu, P., Akbari, M., Comotto, M., Annabi, N., Ghaderi, M., Sonkusale, S., Dokmeci, M.R., and Khademhosseini, A. (2016). Dermal Patch with Integrated Flexible Heater for on Demand Drug Delivery. *Adv. Healthc. Mater.* 5, 175–184.
- Baishanbo, A., Gargala, G., Delaunay, A., François, A., Ballet, J.-J., and Favenec, L. (2005). Infectivity of *Cryptosporidium* hominis and *Cryptosporidium parvum* genotype 2 isolates in immunosuppressed Mongolian gerbils. *Infect. Immun.* 73, 5252–5255.
- Baishanbo, A., Gargala, G., Duclos, C., François, A., Rossignol, J.-F., Ballet, J.-J., and Favenec, L. (2006). Efficacy of nitazoxanide and paromomycin in biliary tract cryptosporidiosis in an immunosuppressed gerbil model. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 353–355.
- Bajer, A., Bednarska, M., Cacciò, S.M., Wolska-Kuśnierz, B., Heropolitanska-Pliszka, E., Bernatowska, E., Wielopolska, M., Paziewska, A., Welc-faleciak, R., and Siński, E. (2008). Genotyping of *Cryptosporidium* isolates from human clinical cases in Poland. *Parasitol. Res.* 103, 37–42.
- Baldursson, S., and Karanis, P. (2011). Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Res.* 45, 6603–6614.
- Bansal, D., Ave, P., Kerneis, S., Frileux, P., Boché, O., Baglin, A.C., Dubost, G., Leguern, A.-S., Prevost, M.-C., Bracha, R., *et al.* (2009). An ex-vivo human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e551.
- Bareiss, P.M., Metzger, M., Sohn, K., Rupp, S., Frick, J.S., Autenrieth, I.B., Lang, F., Schwarz, H., Skutella, T., and Just, L. (2008). Organotypical tissue cultures from adult murine colon as an in vitro model of intestinal mucosa. *Histochem. Cell Biol.* 129, 795–804.
- Bélanger, M.C., and Marois, Y. (2001). Hemocompatibility, biocompatibility, inflammatory and in vivo studies of primary reference materials low-density polyethylene and polydimethylsiloxane: a review. *J. Biomed. Mater. Res.* 58, 467–477.
- Benamrouz, S., Conseil, V., Creusy, C., Calderon, E., Dei-Cas, E., and Certad, G. (2012a). Parasites and malignancies, a review, with emphasis on digestive cancer induced by *Cryptosporidium parvum* (Alveolata: Apicomplexa). *Parasite Paris Fr.* 19, 101–115.
- Benamrouz, S., Guyot, K., Gazzola, S., Mouray, A., Chassat, T., Delaire, B., Chabé, M., Gosset, P., Viscogliosi, E., Dei-Cas, E., *et al.* (2012b). *Cryptosporidium parvum* Infection in SCID Mice Infected with Only One Oocyst: qPCR Assessment of Parasite Replication in Tissues and Development of Digestive Cancer. *PLoS ONE* 7, e51232.
- Benamrouz, S., Conseil, V., Chabé, M., Praet, M., Audebert, C., Blervaque, R., Guyot, K., Gazzola, S., Mouray, A., Chassat, T., *et al.* (2014). *Cryptosporidium parvum*-induced ileo-caecal adenocarcinoma and Wnt signaling in a mouse model. *Dis. Model. Mech.* 7, 693–700.
- Bhatia, S.N., and Ingber, D.E. (2014). Microfluidic organs-on-chips. *Nat. Biotechnol.* 32, 760–772.

- Blackburn, B.G., Mazurek, J.M., Hlavsa, M., Park, J., Tillapaw, M., Parrish, M., Salehi, E., Franks, W., Koch, E., Smith, F., *et al.* (2006). Cryptosporidiosis associated with ozonated apple cider. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 684–686.
- Blutt, S.E., Broughman, J.R., Zou, W., Zeng, X.-L., Karandikar, U.C., In, J., Zachos, N.C., Kovbasnjuk, O., Donowitz, M., and Estes, M.K. (2017). Gastrointestinal microphysiological systems. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 242, 1633–1642.
- Boher, Y., Perez-Schael, I., Caceres-Dittmar, G., Urbina, G., Gonzalez, R., Kraal, G., and Tapia, F.J. (1994). Enumeration of selected leukocytes in the small intestine of BALB/c mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50, 145–151.
- Bouzig, M., Hunter, P.R., Chalmers, R.M., and Tyler, K.M. (2013). *Cryptosporidium* Pathogenicity and Virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 115–134.
- Brasseur, P., Lemeteil, D., and Ballet, J.J. (1988). Rat model for human cryptosporidiosis. *J. Clin. Microbiol.* 26, 1037–1039.
- Bricks, T., Paullier, P., Legendre, A., Fleury, M.-J., Zeller, P., Merlier, F., Anton, P.M., and Leclerc, E. (2014). Development of a new microfluidic platform integrating co-cultures of intestinal and liver cell lines. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 28, 885–895.
- Bridge, J.W., Oliver, D.M., Chadwick, D., Godfray, H.C.J., Heathwaite, A.L., Kay, D., Maheswaran, R., McGonigle, D.F., Nichols, G., Pickup, R., *et al.* (2010). Engaging with the water sector for public health benefits: waterborne pathogens and diseases in developed countries. *Bull. World Health Organ.* 88, 873–875.
- Caradonna, T., Marangi, M., Del Chierico, F., Ferrari, N., Reddel, S., Bracaglia, G., Normanno, G., Putignani, L., and Giangaspero, A. (2017). Detection and prevalence of protozoan parasites in ready-to-eat packaged salads on sale in Italy. *Food Microbiol.* 67, 67–75.
- Carreno, R.A., Matrin, D.S., and Barta, J.R. (1999). *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol. Res.* 85, 899–904.
- Castellanos-Gonzalez, A., Yancey, L.S., Wang, H.-C., Pantenburg, B., Liscum, K.R., Lewis, D.E., and White, A.C. (2008). *Cryptosporidium* infection of human intestinal epithelial cells increases expression of osteoprotegerin: a novel mechanism for evasion of host defenses. *J. Infect. Dis.* 197, 916–923.
- Castellanos-Gonzalez, A., Cabada, M.M., Nichols, J., Gomez, G., and White, A.C. (2013). Human primary intestinal epithelial cells as an improved in vitro model for *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* 81, 1996–2001.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (1997). Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection and cryptosporidiosis associated with drinking unpasteurized apple cider--Connecticut and New York, October 1996. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 46, 4–8.
- Certad, G., Ngouanesavanh, T., Guyot, K., Gantois, N., Chassat, T., Mouray, A., Fleurisse, L., Pinon, A., Cailliez, J.-C., Dei-Cas, E., *et al.* (2007a). *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma. *Infect. Agent. Cancer* 2, 22.

Certad, G., Ngouanesavanh, T., Guyot, K., Gantois, N., Chassat, T., Mouray, A., Fleurisse, L., Pinon, A., Cailliez, J.-C., Dei-Cas, E., *et al.* (2007b). *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma. *Infect. Agent. Cancer* 2, 22.

Certad, G., Creusy, C., Ngouanesavanh, T., Guyot, K., Gantois, N., Mouray, A., Chassat, T., Flament, N., Fleurisse, L., Pinon, A., *et al.* (2010a). Development of *Cryptosporidium parvum*-induced gastrointestinal neoplasia in severe combined immunodeficiency (SCID) mice: severity of lesions is correlated with infection intensity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82, 257–265.

Certad, G., Creusy, C., Guyot, K., Mouray, A., Chassat, T., Delaire, B., Pinon, A., Sitja-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P., Praet, M., *et al.* (2010c). Fulminant cryptosporidiosis associated with digestive adenocarcinoma in SCID mice infected with *Cryptosporidium parvum* TUM1 strain. *Int. J. Parasitol.* 40, 1469–1475.

Certad, G., Creusy, C., Ngouanesavanh, T., Guyot, K., Gantois, N., Mouray, A., Chassat, T., Flament, N., Fleurisse, L., Pinon, A., *et al.* (2010b). Development of *Cryptosporidium parvum*-induced gastrointestinal neoplasia in severe combined immunodeficiency (SCID) mice: severity of lesions is correlated with infection intensity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82, 257–265.

Certad, G., Benamrouz, S., Guyot, K., Mouray, A., Chassat, T., Flament, N., Delhaes, L., Coiteux, V., Delaire, B., Praet, M., *et al.* (2012). Fulminant cryptosporidiosis after near-drowning: a human *Cryptosporidium parvum* strain implicated in invasive gastrointestinal adenocarcinoma and cholangiocarcinoma in an experimental model. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1746–1751.

Certad, G., Osman, M., and Benamrouz, S. (2015). Pathogenesis of *Cryptosporidium* in Humans. In *Human Emerging and Re-Emerging Infections*, S.K. Singh, ed. (John Wiley & Sons, Inc.), pp. 371–391.

Certad, G., Viscogliosi, E., Chabé, M., and Cacciò, S.M. (2017). Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends Parasitol.* 33, 561–576.

Chacín-Bonilla, L. (2007). [*Cryptosporidium*: phylogeny and taxonomy]. *Investig. Clínica* 48, 1–4.

Chalmers, R.M. (2012). Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. *Ann. Ist. Super. Sanita* 48, 429–446.

Chalmers, R.M., and Katzer, F. (2013). Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends Parasitol.* 29, 237–251.

Chalmers, R.M., Robinson, G., Elwin, K., Hadfield, S.J., Xiao, L., Ryan, U., Modha, D., and Mallaghan, C. (2009). *Cryptosporidium* sp. rabbit genotype, a newly identified human pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 829–830.

Cheeseman, K.M., and Weitzman, J.B. (2017). [What makes a parasite “transforming”? Insights into cancer from the agents of an exotic pathology, *Theileria* spp]. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1990 110, 55–60.

Cheeseman, K., Certad, G., and Weitzman, J.B. (2016). [Parasites and cancer: is there a causal link?]. *Med. Sci. MS* 32, 867–873.

Chen, X.M., and LaRusso, N.F. (2000). Mechanisms of attachment and internalization of *Cryptosporidium parvum* to biliary and intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 118, 368–379.

- Chen, S.-Y.C., Hung, P.J., and Lee, P.J. (2011). Microfluidic array for three-dimensional perfusion culture of human mammary epithelial cells. *Biomed. Microdevices* 13, 753–758.
- Chen, W., Harp, J.A., and Harmsen, A.G. (1993). Requirements for CD4⁺ cells and gamma interferon in resolution of established *Cryptosporidium parvum* infection in mice. *Infect. Immun.* 61, 3928–3932.
- Chen, X.M., Levine, S.A., Splinter, P.L., Tietz, P.S., Ganong, A.L., Jobin, C., Gores, G.J., Paya, C.V., and LaRusso, N.F. (2001). *Cryptosporidium parvum* activates nuclear factor kappaB in biliary epithelia preventing epithelial cell apoptosis. *Gastroenterology* 120, 1774–1783.
- Chen, Y., Lin, Y., Davis, K.M., Wang, Q., Rnjak-Kovacina, J., Li, C., Isberg, R.R., Kumamoto, C.A., Mecsas, J., and Kaplan, D.L. (2015). Robust bioengineered 3D functional human intestinal epithelium. *Sci. Rep.* 5, 13708.
- Chi, M., Yi, B., Oh, S., Park, D.-J., Sung, J.H., and Park, S. (2015). A microfluidic cell culture device (μ FCCD) to culture epithelial cells with physiological and morphological properties that mimic those of the human intestine. *Biomed. Microdevices* 17, 9966.
- Chiu, J.-J., and Chien, S. (2011). Effects of Disturbed Flow on Vascular Endothelium: Pathophysiological Basis and Clinical Perspectives. *Physiol. Rev.* 91, 327–387.
- Chrisp, C.E., Reid, W.C., Rush, H.G., Suckow, M.A., Bush, A., and Thomann, M.J. (1990). Cryptosporidiosis in guinea pigs: an animal model. *Infect. Immun.* 58, 674–679.
- Cimetta, E., Cannizzaro, C., James, R., Biechele, T., Moon, R.T., Elvassore, N., and Vunjak-Novakovic, G. (2010). Microfluidic device generating stable concentration gradients for long term cell culture: application to Wnt3a regulation of β -catenin signaling. *Lab. Chip* 10, 3277–3283.
- Corso, P.S., Kramer, M.H., Blair, K.A., Addiss, D.G., Davis, J.P., and Haddix, A.C. (2003). Costs of Illness in the 1993 Waterborne *Cryptosporidium* Outbreak, Milwaukee, Wisconsin. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 426–431.
- Costa, M.O., Harding, J.C.S., and Hill, J.E. (2016). Development and evaluation of a porcine in vitro colon organ culture technique. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 52, 942–952.
- Deng, M.Q., and Cliver, D.O. (2001). Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cider by flash pasteurization. *J. Food Prot.* 64, 523–527.
- Dixon, B., Parrington, L., Cook, A., Pollari, F., and Farber, J. (2013). Detection of Cyclospora, *Cryptosporidium*, and Giardia in ready-to-eat packaged leafy greens in Ontario, Canada. *J. Food Prot.* 76, 307–313.
- van Duinen, V., Trietsch, S.J., Joore, J., Vulto, P., and Hankemeier, T. (2015). Microfluidic 3D cell culture: from tools to tissue models. *Curr. Opin. Biotechnol.* 35, 118–126.
- DuPont, H.L., Chappell, C.L., Sterling, C.R., Okhuysen, P.C., Rose, J.B., and Jakubowski, W. (1995). The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med.* 332, 855–859.
- Duval, K., Grover, H., Han, L.-H., Mou, Y., Pegoraro, A.F., Fredberg, J., and Chen, Z. (2017). Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology* 32, 266–277.

- Elbert, D.L. (2011). Bottom-up tissue engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 674–680.
- Elliott, D.A., Coleman, D.J., Lane, M.A., May, R.C., Machesky, L.M., and Clark, D.P. (2001). *Cryptosporidium parvum* infection requires host cell actin polymerization. *Infect. Immun.* 69, 5940–5942.
- Elwin, K., Hadfield, S.J., Robinson, G., Crouch, N.D., and Chalmers, R.M. (2012). *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007–2011. *Int. J. Parasitol.* 42, 675–682.
- Evans, C.M., Phillips, A.D., Walker-Smith, J.A., and MacDonald, T.T. (1992). Activation of lamina propria T cells induces crypt epithelial proliferation and goblet cell depletion in cultured human fetal colon. *Gut* 33, 230–235.
- Fang, C., Wang, Y., Vu, N.T., Lin, W.-Y., Hsieh, Y.-T., Rubbi, L., Phelps, M.E., Muschen, M., Kim, Y.-M., Chatziioannou, A.F., *et al.* (2010). Integrated microfluidic and imaging platform for a kinase activity radioassay to analyze minute patient cancer samples. *Cancer Res.* 70, 8299–8308.
- Farinetti, A., Zurlo, V., Manenti, A., Coppi, F., and Mattioli, A.V. (2017). Mediterranean diet and colorectal cancer: A systematic review. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 43–44, 83–88.
- Fayer, R. (2010). Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol.* 124, 90–97.
- Fayer, R., Santín, M., and Macarisin, D. (2010). *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet. Parasitol.* 172, 23–32.
- Firpo, G., Angeli, E., Repetto, L., and Valbusa, U. (2015). Permeability thickness dependence of polydimethylsiloxane (PDMS) membranes. *J. Membr. Sci.* 481, 1–8.
- Franco, R.M.B., and Cantusio Neto, R. (2002). Occurrence of cryptosporidial oocysts and giardia cysts in bottled mineral water commercialized in the city of Campinas, State of São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 205–207.
- Frey, O., Misun, P.M., Fluri, D.A., Hengstler, J.G., and Hierlemann, A. (2014). Reconfigurable microfluidic hanging drop network for multi-tissue interaction and analysis. *Nat. Commun.* 5, 4250.
- Garza, A., Castellanos-Gonzalez, A., Castenallos-Gonzalez, A., Griffiths, J., and Robinson, P. (2008). Infection of immunocompetent mice with acid-water-pretreated *Cryptosporidium parvum* results in weight loss, and intestinal (structural and physiological) alterations. *Parasitol. Res.* 102, 457–463.
- Gayer, C.P., and Basson, M.D. (2009). The effects of mechanical forces on intestinal physiology and pathology. *Cell. Signal.* 21, 1237–1244.
- Gilgenkrantz, S. (2014). [Sixty years of HeLa cell cultures]. *Hist. Sci. Medicales* 48, 139–144.
- Giridharan, G.A., Nguyen, M.-D., Estrada, R., Parichehreh, V., Hamid, T., Ismahil, M.A., Prabhu, S.D., and Sethu, P. (2010). Microfluidic cardiac cell culture model (μ CCCM). *Anal. Chem.* 82, 7581–7587.

- Goral, V.N., Tran, E., and Yuen, P.K. (2015). A pump-free membrane-controlled perfusion microfluidic platform. *Biomicrofluidics* 9.
- Gorla, S.K., McNair, N.N., Yang, G., Gao, S., Hu, M., Jala, V.R., Haribabu, B., Striepen, B., Cuny, G.D., Mead, J.R., *et al.* (2014). Validation of IMP dehydrogenase inhibitors in a mouse model of cryptosporidiosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 1603–1614.
- Gunawan, R.C., Silvestre, J., Gaskins, H.R., Kenis, P.J.A., and Leckband, D.E. (2006). Cell migration and polarity on microfabricated gradients of extracellular matrix proteins. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 22, 4250–4258.
- Gustafsson, J.K., Ermund, A., Johansson, M.E.V., Schütte, A., Hansson, G.C., and Sjövall, H. (2012). An ex vivo method for studying mucus formation, properties, and thickness in human colonic biopsies and mouse small and large intestinal explants. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 302, G430–G438.
- Guyot, K., and Derouin, F. (2012). Actualités sur l'épidémiologie et le diagnostic de la cryptosporidiose. *Feuill. Biol.* 21–29.
- Harari, M.D., West, B., and Dwyer, B. (1986). *Cryptosporidium* as cause of laryngotracheitis in an infant. *Lancet Lond. Engl.* 1, 1207.
- Harp, J.A., Wannemuehler, M.W., Woodmansee, D.B., and Moon, H.W. (1988). Susceptibility of germfree or antibiotic-treated adult mice to *Cryptosporidium parvum*. *Infect. Immun.* 56, 2006–2010.
- Harrison, H.H., Miller, K.L., Dickinson, C., and Daufeldt, J.A. (1992). Quality assurance and reproducibility of high-resolution two-dimensional electrophoresis and silver staining in polyacrylamide gels. *Am. J. Clin. Pathol.* 97, 97–105.
- Hattersley, S.M., Greenman, J., and Haswell, S.J. (2011). Study of ethanol induced toxicity in liver explants using microfluidic devices. *Biomed. Microdevices* 13, 1005–1014.
- Hayward, A.R., Levy, J., Facchetti, F., Notarangelo, L., Ochs, H.D., Etzioni, A., Bonnefoy, J.Y., Cosyns, M., and Weinberg, A. (1997). Cholangiopathy and tumors of the pancreas, liver, and biliary tree in boys with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *J. Immunol. Baltim. Md* 158, 977–983.
- Hayward, A.R., Cosyns, M., Jones, M., and Ponnuraj, E.M. (2001). Marrow-derived CD40-positive cells are required for mice to clear *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* 69, 1630–1634.
- He, J., Mao, M., Liu, Y., Zhu, L., and Li, D. (2013). Bottom-up fabrication of 3D cell-laden microfluidic constructs. *Mater. Lett.* 90, 93–96.
- Heine, J., Moon, H.W., and Woodmansee, D.B. (1984). Persistent *Cryptosporidium* infection in congenitally athymic (nude) mice. *Infect. Immun.* 43, 856–859.
- van der Helm, M.W., van der Meer, A.D., Eijkel, J.C.T., van den Berg, A., and Segerink, L.I. (2016). Microfluidic organ-on-chip technology for blood-brain barrier research. *Tissue Barriers* 4, e1142493.

- Hemphill, A., Mueller, J., and Esposito, M. (2006). Nitazoxanide, a broad-spectrum thiazolide anti-infective agent for the treatment of gastrointestinal infections. *Expert Opin. Pharmacother.* 7, 953–964.
- Hershberg, R.M., and Mayer, L.F. (2000). Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. *Immunol. Today* 21, 123–128.
- Heussler, V.T., Küenzi, P., and Rottenberg, S. (2001). Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int. J. Parasitol.* 31, 1166–1176.
- Hijjawi, N.S., Meloni, B.P., Ng'anzo, M., Ryan, U.M., Olson, M.E., Cox, P.T., Monis, P.T., and Thompson, R.C.A. (2004). Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *Int. J. Parasitol.* 34, 769–777.
- Holton, A.B., Sinatra, F.L., Krehling, J., Conway, A.J., Landis, D.A., and Altiok, S. (2017). Microfluidic Biopsy Trapping Device for the Real-Time Monitoring of Tumor Microenvironment. *PLoS ONE* 12.
- Horne, S., Sibal, B., Sibal, N., and Green, H.K. (2017). *Cryptosporidium* outbreaks: identification, diagnosis, and management. *Br. J. Gen. Pract. J. R. Coll. Gen. Pract.* 67, 425–426.
- Hsiao, A.Y., Torisawa, Y., Tung, Y.-C., Sud, S., Taichman, R.S., Pienta, K.J., and Takayama, S. (2009). Microfluidic system for formation of PC-3 prostate cancer co-culture spheroids. *Biomaterials* 30, 3020–3027.
- Huang, D.B., and White, A.C. (2006). An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 35, 291–314, viii.
- Huang, Y., Castrataro, P., Lee, C.-C., and Quake, S.R. (2007). Solvent resistant microfluidic DNA synthesizer. *Lab. Chip* 7, 24–26.
- Huh, D., Matthews, B.D., Mammoto, A., Montoya-Zavala, M., Hsin, H.Y., and Ingber, D.E. (2010). Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science* 328, 1662–1668.
- Huh, D., Hamilton, G.A., and Ingber, D.E. (2011). From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol.* 21, 745–754.
- Ionescu, A., Zahavi, E.E., Gradus, T., Ben-Yaakov, K., and Perlson, E. (2016). Compartmental microfluidic system for studying muscle-neuron communication and neuromuscular junction maintenance. *Eur. J. Cell Biol.* 95, 69–88.
- Isshiki, H., Arimura, Y., Nagaishi, K., Kawakami, K., Onodera, K., Yamashita, K., Naishiro, Y., Fujimiya, M., Imai, K., and Shinomura, Y. (2017). Establishment of a refined culture method for rat colon organoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 489, 305–311.
- Izquierdo, J., Antúnez, I., Calderón, M.T., Pérez Giraldo, C., and Muñoz Sanz, A. (1988). [Diarrhea caused by *Cryptosporidium* and colonic neoplasia]. *Rev. Clin. Esp.* 182, 393–394.
- Jakobi, V., and Petry, F. (2008). Humoral immune response in IL-12 and IFN-gamma deficient mice after infection with *Cryptosporidium parvum*. *Parasite Immunol.* 30, 151–161.

- Jang, K., Sato, K., Igawa, K., Chung, U., and Kitamori, T. (2008). Development of an osteoblast-based 3D continuous-perfusion microfluidic system for drug screening. *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 825–832.
- Jirků, M., Valigurová, A., Koudela, B., Krízek, J., Modrý, D., and Slapeta, J. (2008). New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitol. (Praha)* 55, 81–94.
- Karanis, P. (2017). The truth about in vitro culture of *Cryptosporidium* species. *Parasitology* 1–10.
- Karanis, P., and Aldeyarbi, H.M. (2011). Evolution of *Cryptosporidium* in vitro culture. *Int. J. Parasitol.* 41, 1231–1242.
- Kashaninejad, N., Nikmaneshi, M.R., Moghadas, H., Kiyomarsi Oskouei, A., Rismanian, M., Barisam, M., Saidi, M.S., and Firoozabadi, B. (2016). Organ-Tumor-on-a-Chip for Chemosensitivity Assay: A Critical Review. *Micromachines* 7, 130.
- Kessler, R., and Manz, H.J. (1990). Characterization of artificial liposomes with free-flow electrophoresis. *Electrophoresis* 11, 979–980.
- Khademhosseini, A., Langer, R., Borenstein, J., and Vacanti, J.P. (2006). Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2480–2487.
- Kim, H.J., Li, H., Collins, J.J., and Ingber, D.E. (2016). Contributions of microbiome and mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human gut-on-a-chip. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E7–E15.
- Kim, Y., Joshi, S.D., Messner, W.C., LeDuc, P.R., and Davidson, L.A. (2011). Detection of Dynamic Spatiotemporal Response to Periodic Chemical Stimulation in a *Xenopus* Embryonic Tissue. *PLoS ONE* 6.
- Konar, D., Devarasetty, M., Yildiz, D.V., Atala, A., and Murphy, S.V. (2016). Lung-On-A-Chip Technologies for Disease Modeling and Drug Development. *Biomed. Eng. Comput. Biol.* 7, 17–27.
- Kotloff, K.L. (2017). The Burden and Etiology of Diarrheal Illness in Developing Countries. *Pediatr. Clin. North Am.* 64, 799–814.
- Kotloff, K.L., Nataro, J.P., Blackwelder, W.C., Nasrin, D., Farag, T.H., Panchalingam, S., Wu, Y., Sow, S.O., Sur, D., Breiman, R.F., *et al.* (2013). Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet Lond. Engl.* 382, 209–222.
- Kovarík, M.L., Gach, P.C., Ornoff, D.M., Wang, Y., Balowski, J., Farrag, L., and Allbritton, N.L. (2012). Micro Total Analysis Systems for Cell Biology and Biochemical Assays. *Anal. Chem.* 84, 516–540.
- Küchler, S., Strüver, K., and Friess, W. (2013). Reconstructed skin models as emerging tools for drug absorption studies. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 9, 1255–1263.
- Kuo, C.-H., Wares, J.P., and Kissinger, J.C. (2008). The Apicomplexan whole-genome phylogeny: an analysis of incongruence among gene trees. *Mol. Biol. Evol.* 25, 2689–2698.

- Kvác, M., Ondráčková, Z., Kvetonová, D., Sak, B., and Vítovec, J. (2007). Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Vet. Parasitol.* 143, 229–233.
- Lacharme, L., Villar, V., Rojo-Vazquez, F.A., and Suárez, S. (2004). Complete development of *Cryptosporidium parvum* in rabbit chondrocytes (VELI cells). *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 6, 566–571.
- Laschke, M.W., and Menger, M.D. (2017). Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering. *Trends Biotechnol.* 35, 133–144.
- Laurent, F., Kagnoff, M.F., Savidge, T.C., Naciri, M., and Eckmann, L. (1998). Human intestinal epithelial cells respond to *Cryptosporidium parvum* infection with increased prostaglandin H synthase 2 expression and prostaglandin E2 and F2alpha production. *Infect. Immun.* 66, 1787–1790.
- Lecointre, G., and Guyader, H.L. (2001). Classification phylogénétique du vivant (Paris: Belin).
- Lee, P.J., Gaige, T.A., Ghorashian, N., and Hung, P.J. (2007). Microfluidic tissue model for live cell screening. *Biotechnol. Prog.* 23, 946–951.
- Lee, S., Harwood, M., Girouard, D., Meyers, M.J., Campbell, M.A., Beamer, G., and Tzipori, S. (2017). The therapeutic efficacy of azithromycin and nitazoxanide in the acute pig model of *Cryptosporidium hominis*. *PloS One* 12, e0185906.
- Leitch, G.J., and He, Q. (1999). Reactive nitrogen and oxygen species ameliorate experimental cryptosporidiosis in the neonatal BALB/c mouse model. *Infect. Immun.* 67, 5885–5891.
- Leitch, G.J., and He, Q. (2012). Cryptosporidiosis-an overview. *J. Biomed. Res.* 25, 1–16.
- Leven, E.A., Maffucci, P., Ochs, H.D., Scholl, P.R., Buckley, R.H., Fuleihan, R.L., Geha, R.S., Cunningham, C.K., Bonilla, F.A., Conley, M.E., *et al.* (2016). Hyper IgM Syndrome: a Report from the USIDNET Registry. *J. Clin. Immunol.* 36, 490–501.
- Levsky, J.M., and Singer, R.H. (2003). Gene expression and the myth of the average cell. *Trends Cell Biol.* 13, 4–6.
- Li, J., Liang, C., Wang, S., and Liu, C. (2017). Using serrated edges to control fluid front motion in microfluidic devices. *Microsyst. Technol.* 23, 4733–4740.
- Li, N., Xiao, L., Alderisio, K., Elwin, K., Cebelinski, E., Chalmers, R., Santin, M., Fayer, R., Kvác, M., Ryan, U., *et al.* (2014). Subtyping *Cryptosporidium ubiquitum*, a zoonotic pathogen emerging in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 217–224.
- Liu, J., Deng, M., Lancto, C.A., Abrahamsen, M.S., Rutherford, M.S., and Enomoto, S. (2009). Biphasic modulation of apoptotic pathways in *Cryptosporidium parvum*-infected human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 77, 837–849.
- Liu, W., Xu, J., Li, T., Zhao, L., Ma, C., Shen, S., and Wang, J. (2015). Monitoring Tumor Response to Anticancer Drugs Using Stable Three-Dimensional Culture in a Recyclable Microfluidic Platform. *Anal. Chem.* 87, 9752–9760.

- López-Vélez, R., Tarazona, R., Garcia Camacho, A., Gomez-Mampaso, E., Guerrero, A., Moreira, V., and Villanueva, R. (1995). Intestinal and extraintestinal cryptosporidiosis in AIDS patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 14, 677–681.
- Lucio-Forster, A., Griffiths, J.K., Cama, V.A., Xiao, L., and Bowman, D.D. (2010). Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. *Trends Parasitol.* 26, 174–179.
- Lycans, R.M., Day, B.S., Higgins, C.B., Blough, E.R., and Tanner, M.S. (2014). Plasma treatment of PDMS for applications of in vitro motility assays. *Colloids Surf. B Biointerfaces.*
- Mac Kenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., and Rose, J.B. (1994). A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.* 331, 161–167.
- Magalhaes, J.G., Tattoli, I., and Girardin, S.E. (2007). The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin. Immunol.* 19, 106–115.
- Mäki, A.-J., Peltokangas, M., Kreutzer, J., Auvinen, S., and Kallio, P. (2015). Modeling carbon dioxide transport in PDMS-based microfluidic cell culture devices. *Chem. Eng. Sci.* 137, 515–524.
- Manjunatha, U.H., Chao, A.T., Leong, F.J., and Diagana, T.T. (2016). Cryptosporidiosis Drug Discovery: Opportunities and Challenges. *ACS Infect. Dis.* 2, 530–537.
- Marcos, L.A., and Gotuzzo, E. (2013). Intestinal protozoan infections in the immunocompromised host. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 26, 295–301.
- Maschmeyer, I., Hasenberg, T., Jaenicke, A., Lindner, M., Lorenz, A.K., Zech, J., Garbe, L.-A., Sonntag, F., Hayden, P., Ayehunie, S., *et al.* (2015). Chip-based human liver-intestine and liver-skin co-cultures--A first step toward systemic repeated dose substance testing in vitro. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* 95, 77–87.
- Mathur, A., Loskill, P., Hong, S., Lee, J., Marcus, S.G., Dumont, L., Conklin, B.R., Willenbring, H., Lee, L.P., and Healy, K.E. (2013). Human induced pluripotent stem cell-based microphysiological tissue models of myocardium and liver for drug development. *Stem Cell Res. Ther.* 4 Suppl 1, S14.
- Mazzitelli, S., Capretto, L., Carugo, D., Zhang, X., Piva, R., and Nastruzzi, C. (2011). Optimised production of multifunctional microfibres by microfluidic chip technology for tissue engineering applications. *Lab. Chip* 11, 1776–1785.
- McClelland, K.S., and Bowles, J. (2016). Culturing murine embryonic organs: Pros, cons, tips and tricks. *Differ. Res. Biol. Divers.* 91, 50–56.
- McDonald, V. (2000). Host cell-mediated responses to infection with *Cryptosporidium*. *Parasite Immunol.* 22, 597–604.
- McDonald, V., Deer, R., Uni, S., Iseki, M., and Bancroft, G.J. (1992). Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and SCID) mice. *Infect. Immun.* 60, 3325–3331.

- McDonald, V., Robinson, H.A., Kelly, J.P., and Bancroft, G.J. (1994). *Cryptosporidium muris* in adult mice: adoptive transfer of immunity and protective roles of CD4 versus CD8 cells. *Infect. Immun.* 62, 2289–2294.
- Mead, J.R., Arrowood, M.J., Healey, M.C., and Sidwell, R.W. (1991). Cryptosporidial infections in SCID mice reconstituted with human or murine lymphocytes. *J. Protozool.* 38, 59S–61S.
- van der Meer, A.D., Orlova, V.V., ten Dijke, P., van den Berg, A., and Mummery, C.L. (2013). Three-dimensional co-cultures of human endothelial cells and embryonic stem cell-derived pericytes inside a microfluidic device. *Lab. Chip* 13, 3562–3568.
- Mehran Mirza-Qavami, S., and Sadraei, J. (2011). An examination of *Cryptosporidium parvum* infection in neonate BALB/c mice and rats. *Jundishapur J. Microbiol.* 4, 185–190.
- Meisel, J.L., Perera, D.R., Meligro, C., and Rubin, C.E. (1976). Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 70, 1156–1160.
- Mele, R., Gomez Morales, M.A., Tosini, F., and Pozio, E. (2004). *Cryptosporidium parvum* at different developmental stages modulates host cell apoptosis in vitro. *Infect. Immun.* 72, 6061–6067.
- Metzger, M., Bareiss, P.M., Nikolov, I., Skutella, T., and Just, L. (2007). Three-dimensional slice cultures from murine fetal gut for investigations of the enteric nervous system. *Dev. Dyn.* 236, 128–133.
- Millard, P.S., Gensheimer, K.F., Addiss, D.G., Sosin, D.M., Beckett, G.A., Houck-Jankoski, A., and Hudson, A. (1994). An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. *JAMA* 272, 1592–1596.
- Mina, S.G., Huang, P., Murray, B.T., and Mahler, G.J. (2017). The role of shear stress and altered tissue properties on endothelial to mesenchymal transformation and tumor-endothelial cell interaction. *Biomicrofluidics* 11, 044104.
- Miura, T., and Yokokawa, R. (2016). Tissue culture on a chip: Developmental biology applications of self-organized capillary networks in microfluidic devices. *Dev. Growth Differ.* 58, 505–515.
- Mor, S.M., Tumwine, J.K., Ndeezi, G., Srinivasan, M.G., Kaddu-Mulindwa, D.H., Tzipori, S., and Griffiths, J.K. (2010). Respiratory cryptosporidiosis in HIV-seronegative children in Uganda: potential for respiratory transmission. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 50, 1366–1372.
- Morada, M., Lee, S., Gunther-Cummins, L., Weiss, L.M., Widmer, G., Tzipori, S., and Yarlett, N. (2016). Continuous culture of *Cryptosporidium parvum* using hollow fiber technology. *Int. J. Parasitol.* 46, 21–29.
- Morgan, U.M., Xiao, L., Fayer, R., Lal, A.A., and Thompson, R.C. (2000). Epidemiology and strain variation of *Cryptosporidium parvum*. *Contrib. Microbiol.* 6, 116–139.
- Morimoto, Y., Hsiao, A.Y., and Takeuchi, S. (2015). Point-, line-, and plane-shaped cellular constructs for 3D tissue assembly. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 95, 29–39.

- Mota, A., Mena, K.D., Soto-Beltran, M., Tarwater, P.M., and Cháidez, C. (2009). Risk assessment of *Cryptosporidium* and giardia in water irrigating fresh produce in Mexico. *J. Food Prot.* 72, 2184–2188.
- Munro, M.J., Wickremesekera, S.K., Peng, L., Tan, S.T., and Itinteang, T. (2017). Cancer stem cells in colorectal cancer: a review. *J. Clin. Pathol.*
- Nakajima, A., Ishida, M., Fujimori, T., Wakamoto, Y., and Sawai, S. (2016). The microfluidic lighthouse: an omnidirectional gradient generator. *Lab. Chip* 16, 4382–4394.
- Nery, F.C., da Hora, C.C., Yaqub, U., Zhang, X., McCarthy, D.M., Bhide, P.G., Irimia, D., and Breakefield, X.O. (2015). New methods for investigation of neuronal migration in embryonic brain explants. *J. Neurosci. Methods* 0, 80–84.
- Ng, C.P., and Pun, S.H. (2008). A perfusable 3D cell-matrix tissue culture chamber for in situ evaluation of nanoparticle vehicle penetration and transport. *Biotechnol. Bioeng.* 99, 1490–1501.
- Ng, E.X., Miller, M.A., Jing, T., and Chen, C.-H. (2016). Single cell multiplexed assay for proteolytic activity using droplet microfluidics. *Biosens. Bioelectron.* 81, 408–414.
- Nime, F.A., Burek, J.D., Page, D.L., Holscher, M.A., and Yardley, J.H. (1976). Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70, 592–598.
- Novo, P., Volpetti, F., Chu, V., and Conde, J.P. (2013). Control of sequential fluid delivery in a fully autonomous capillary microfluidic device. *Lab. Chip* 13, 641–645.
- O'Hara, S.P., and Chen, X.-M. (2011). The cell biology of *Cryptosporidium* infection. *Microbes Infect.* 13, 721–730.
- Ohayon, J., Finet, G., Gharib, A.M., Herzka, D.A., Tracqui, P., Heroux, J., Rioufol, G., Kotys, M.S., Elagha, A., and Pettigrew, R.I. (2008). Necrotic core thickness and positive arterial remodeling index: emergent biomechanical factors for evaluating the risk of plaque rupture. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H717-727.
- Okazawa, A., Kanai, T., Nakamaru, K., Sato, T., Inoue, N., Ogata, H., Iwao, Y., Ikeda, M., Kawamura, T., Makita, S., *et al.* (2004). Human intestinal epithelial cell-derived interleukin (IL)-18, along with IL-2, IL-7 and IL-15, is a potent synergistic factor for the proliferation of intraepithelial lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 136, 269–276.
- Okhuysen, P.C., and Chappell, C.L. (2002). *Cryptosporidium* virulence determinants--are we there yet? *Int. J. Parasitol.* 32, 517–525.
- Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., Crabb, J.H., Sterling, C.R., and DuPont, H.L. (1999). Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *J. Infect. Dis.* 180, 1275–1281.
- Oliveira, A.F., Pessoa, A.C.S.N., Bastos, R.G., Torre, D.L., and G, L. (2016). Microfluidic tools toward industrial biotechnology. *Biotechnol. Prog.* 32, 1372–1389.
- Ortega, Y.R., and Sanchez, R. (2010). Update on *Cyclospora cayetanensis*, a Food-Borne and Waterborne Parasite. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 218–234.

- Ortega, Y.R., Mann, A., Torres, M.P., and Cama, V. (2008). Efficacy of gaseous chlorine dioxide as a sanitizer against *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, and *Encephalitozoon intestinalis* on produce. *J. Food Prot.* 71, 2410–2414.
- Ortega-Pierres, G., Smith, H.V., Cacciò, S.M., and Thompson, R.C.A. (2009). New tools provide further insights into *Giardia* and *Cryptosporidium* biology. *Trends Parasitol.* 25, 410–416.
- Osman, M., El Safadi, D., Benamrouz, S., Guyot, K., Dei-Cas, E., Aliouat, E.M., Creusy, C., Mallat, H., Hamze, M., Dabboussi, F., *et al.* (2015). Initial data on the molecular epidemiology of cryptosporidiosis in Lebanon. *PloS One* 10, e0125129.
- Osman, M., El Safadi, D., Cian, A., Benamrouz, S., Nourrisson, C., Poirier, P., Pereira, B., Razakandrainibe, R., Pinon, A., Lambert, C., *et al.* (2016). Prevalence and Risk Factors for Intestinal Protozoan Infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among Schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004496.
- Ota, H., Yamamoto, R., Deguchi, K., Tanaka, Y., Kazoe, Y., Sato, Y., and Miki, N. (2010). Three-dimensional spheroid-forming lab-on-a-chip using micro-rotational flow. *Sens. Actuators B Chem.* 147, 359–365.
- Palmer, C.J., Xiao, L., Terashima, A., Guerra, H., Gotuzzo, E., Saldías, G., Bonilla, J.A., Zhou, L., Lindquist, A., and Upton, S.J. (2003). *Cryptosporidium muris*, a rodent pathogen, recovered from a human in Perú. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 1174–1176.
- Park, H.S., Liu, S., McDonald, J., Thakor, N., and Yang, I.H. (2013). Neuromuscular junction in a microfluidic device. *Conf. Proc. Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Annu. Conf. 2013*, 2833–2835.
- Parsa, N. (2012). Environmental Factors Inducing Human Cancers. *Iran. J. Public Health* 41, 1–9.
- Patel, P., Hanson, D.L., Sullivan, P.S., Novak, R.M., Moorman, A.C., Tong, T.C., Holmberg, S.D., Brooks, J.T., and Adult and Adolescent Spectrum of Disease Project and HIV Outpatient Study Investigators (2008). Incidence of types of cancer among HIV-infected persons compared with the general population in the United States, 1992–2003. *Ann. Intern. Med.* 148, 728–736.
- Perrimon, N., Ni, J.-Q., and Perkins, L. (2010). In vivo RNAi: Today and Tomorrow. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a003640.
- Petry, F., Jakobi, V., and Tessema, T.S. (2010). Host immune response to *Cryptosporidium parvum* infection. *Exp. Parasitol.* 126, 304–309.
- Platts-Mills, J.A., Babji, S., Bodhidatta, L., Gratz, J., Haque, R., Havt, A., McCormick, B.J., McGrath, M., Olortegui, M.P., Samie, A., *et al.* (2015). Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). *Lancet Glob. Health* 3, e564–575.
- Plutzer, J., and Karanis, P. (2009). Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Vet. Parasitol.* 165, 187–199.
- Pohlenz, J., Bemrick, W.J., Moon, H.W., and Cheville, N.F. (1978). Bovine cryptosporidiosis: a transmission and scanning electron microscopic study of some stages in the life cycle and of the host-parasite relationship. *Vet. Pathol.* 15, 417–427.

- Polacheck, W.J., Li, R., Uzel, S.G.M., and Kamm, R.D. (2013). Microfluidic platforms for mechanobiology. *Lab. Chip* 13, 2252–2267.
- Ramadan, Q., and Jing, L. (2016). Characterization of tight junction disruption and immune response modulation in a miniaturized Caco-2/U937 coculture-based in vitro model of the human intestinal barrier. *Biomed. Microdevices* 18, 11.
- Ramratnam, B., and Flanigan, T.P. (1997). Cryptosporidiosis in persons with HIV infection. *Postgrad. Med. J.* 73, 713–716.
- Rasmussen, K.R., and Healey, M.C. (1992). *Cryptosporidium parvum*: experimental infections in aged Syrian golden hamsters. *J. Infect. Dis.* 165, 769–772.
- Rennert, K., Steinborn, S., Gröger, M., Ungerböck, B., Jank, A.-M., Ehgartner, J., Nietzsche, S., Dinger, J., Kiehntopf, M., Funke, H., *et al.* (2015). A microfluidically perfused three dimensional human liver model. *Biomaterials* 71, 119–131.
- Reynolds, K.A., Mena, K.D., and Gerba, C.P. (2008). Risk of waterborne illness via drinking water in the United States. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 192, 117–158.
- Rhee, J.K., So, W.S., and Kim, H.-C. (1999). Age-dependent resistance to *Cryptosporidium muris* (strain MCR) infection in golden hamsters and mice. *Korean J. Parasitol.* 37, 33–37.
- Roberts, S.A., DiVito, K.A., Ligler, F.S., Adams, A.A., and Daniele, M.A. (2016). Microvessel manifold for perfusion and media exchange in three-dimensional cell cultures. *Biomicrofluidics* 10, 054109.
- Rosser, J., Olmos Calvo, I., Peter, E., Jenner, F., Purtscher, M., and Shlager, M. (2015). Recent Advances of Biologically Inspired 3D Microfluidic Hydrogel Cell Culture Systems. *Her. J. Cell Biol. Cell Metab.* 2.
- Rossi, P., Pozio, E., Besse, M.G., Gomez Morales, M.A., and La Rosa, G. (1990). Experimental cryptosporidiosis in hamsters. *J. Clin. Microbiol.* 28, 356–357.
- Rossignol, J.-F. (2010). *Cryptosporidium* and Giardia: treatment options and prospects for new drugs. *Exp. Parasitol.* 124, 45–53.
- Ryan, U., Fayer, R., and Xiao, L. (2014). *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology* 141, 1667–1685.
- Ryan, U., Paparini, A., Monis, P., and Hijjaw, N. (2016a). It's official - *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? *Water Res.* 105, 305–313.
- Ryan, U., Zahedi, A., and Paparini, A. (2016b). *Cryptosporidium* in humans and animals-a one health approach to prophylaxis. *Parasite Immunol.* 38, 535–547.
- Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., *et al.* (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262–265.

- Sayed, F.G., Hamza, A.I., Galal, L.A., Sayed, D.M., and Gaber, M. (2016). Virulence of geographically different *Cryptosporidium parvum* isolates in experimental animal model. *Ann. Parasitol.* 62, 221–232.
- Schwarz, J., Bierbaum, V., Merrin, J., Frank, T., Hauschild, R., Bollenbach, T., Tay, S., Sixt, M., and Mehling, M. (2016). A microfluidic device for measuring cell migration towards substrate-bound and soluble chemokine gradients. *Sci. Rep.* 6.
- Shebl, F.M., Engels, E.A., and Goedert, J.J. (2012). Opportunistic intestinal infections and risk of colorectal cancer among people with AIDS. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 28, 994–999.
- Shen, D.F., Herbort, C.P., Tuailon, N., Buggage, R.R., Egwuagu, C.E., and Chan, C.C. (2001). Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in primary intraocular B-cell lymphoma. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 14, 995–999.
- Sherwood, D., Angus, K.W., Snodgrass, D.R., and Tzipori, S. (1982). Experimental cryptosporidiosis in laboratory mice. *Infect. Immun.* 38, 471–475.
- Shi, M., Majumdar, D., Gao, Y., Brewer, B., Goodwin, C.R., McLean, J.A., Li, D., and Webb, D.J. (2013). Glia Co-Culture with Neurons in Microfluidic Platforms Promotes the Formation and Stabilization of Synaptic Contacts. *Lab. Chip* 13, 3008–3021.
- Slapeta, J. (2012). The name *Cryptosporidium tyzzeri* Ren, Zhao, Zhang, Ning, Jian, Wang, Lv, Wang, Arrowood and Xiao, 2012 is permanently invalid. *Exp. Parasitol.* 130, 306–307.
- Slifko, T.R., Raghubeer, E., and Rose, J.B. (2000). Effect of high hydrostatic pressure on *Cryptosporidium parvum* infectivity. *J. Food Prot.* 63, 1262–1267.
- Solaymani-Mohammadi, S., and Singer, S.M. (2013). Regulation of intestinal epithelial cell cytoskeletal remodeling by cellular immunity following gut infection. *Mucosal Immunol.* 6, 369–378.
- Souza, L. do R. de, Rodrigues, M.A.M., Morceli, J., Kemp, R., and Mendes, R.P. (2004). Cryptosporidiosis of the biliary tract mimicking pancreatic cancer in an AIDS patient. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 37, 182–185.
- Spano, F., and Crisanti, A. (2000). *Cryptosporidium parvum*: the many secrets of a small genome. *Int. J. Parasitol.* 30, 553–565.
- Squire, S.A., and Ryan, U. (2017). *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: current and future challenges. *Parasit. Vectors* 10, 195.
- Striepen, B. (2013). Parasitic infections: Time to tackle cryptosporidiosis. *Nature* 503, 189–191.
- Sulzyc-Bielicka, V., Kuźna-Grygiel, W., Kołodziejczyk, L., Bielicki, D., Kładny, J., Stepień-Korzonek, M., and Telatyńska-Smieszek, B. (2007). Cryptosporidiosis in patients with colorectal cancer. *J. Parasitol.* 93, 722–724.
- Sulzyc-Bielicka, V., Kołodziejczyk, L., Jaczewska, S., Bielicki, D., Kładny, J., and Safranow, K. (2012). Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in patients with colorectal cancer. *Pol. Przegl. Chir.* 84, 348–351.

- Surl, C.-G., and Kim, H.-C. (2006). Concurrent response to challenge infection with *Cryptosporidium parvum* in immunosuppressed C57BL/6N mice. *J. Vet. Sci.* 7, 47–51.
- Tanyüksel, M., Gün, H., and Doğanci, L. (1995). Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in patients with neoplasia and diarrhea. *Scand. J. Infect. Dis.* 27, 69–70.
- Tavana, H., Zamankhan, P., Christensen, P.J., Grotberg, J.B., and Takayama, S. (2011). Epithelium damage and protection during reopening of occluded airways in a physiologic microfluidic pulmonary airway model. *Biomed. Microdevices* 13, 731–742.
- Tay, S., Hughey, J.J., Lee, T.K., Lipniacki, T., Quake, S.R., and Covert, M.W. (2010). Single-cell NF-kappaB dynamics reveal digital activation and analogue information processing. *Nature* 466, 267–271.
- Taylor, M.A., Marshall, R.N., Green, J.A., and Catchpole, J. (1999). The pathogenesis of experimental infections of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in outbred nude mice. *Vet. Parasitol.* 86, 41–48.
- Toepke, M.W., and Beebe, D.J. (2006). PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications. *Lab. Chip* 6, 1484–1486.
- Toh, Y.-C., Zhang, C., Zhang, J., Khong, Y.M., Chang, S., Samper, V.D., van Noort, D., Hutmacher, D.W., and Yu, H. (2007). A novel 3D mammalian cell perfusion-culture system in microfluidic channels. *Lab. Chip* 7, 302–309.
- Tomizawa, D., Imai, K., Ito, S., Kajiwar, M., Minegishi, Y., Nagasawa, M., Morio, T., Nonoyama, S., and Mizutani, S. (2004). Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for seven children with X-linked hyper-IgM syndrome: a single center experience. *Am. J. Hematol.* 76, 33–39.
- Tourovskaya, A., Figueroa-Masot, X., and Folch, A. (2005). Differentiation-on-a-chip: a microfluidic platform for long-term cell culture studies. *Lab. Chip* 5, 14–19.
- Tyzzer, E.E. (1910). An extracellular Coccidium, *Cryptosporidium Muris* (Gen. Et Sp. Nov.), of the gastric Glands of the Common Mouse. *J. Med. Res.* 23, 487–510.3.
- Ujjini H. Manjunatha, Sumiti Vinayak, Jennifer A. Zambriski, Alexander T. Chao, Tracy Sy, Christian G. Noble, Ghislain M.C. Bonamy, Ravinder R. Kondreddi, Bin Zou, Peter Gedeck, Carrie F. Brooks, Gillian T. Herbert, Adam Sateriale, Jayesh Tandel, Susan Noh, Suresh B. Lakshminarayana, Siau H. Lim, Laura B. Goodman, Christophe Bodenreider, Gu Feng, Lijun Zhang, Francesca Blasco, Juergen Wagner, F. Joel Leong, Boris Striepen, Thierry T. Diagana (2017) A *Cryptosporidium* PI(4)K inhibitor is a drug candidate for cryptosporidiosis *Nature*. 546(7658): 376–380. Published online 2017 May 31. doi: 10.1038/nature22337
- Ungar, B.L., Kao, T.C., Burris, J.A., and Finkelman, F.D. (1991). *Cryptosporidium* infection in an adult mouse model. Independent roles for IFN-gamma and CD4+ T lymphocytes in protective immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 147, 1014–1022.
- Unger, M.A., Chou, H.P., Thorsen, T., Scherer, A., and Quake, S.R. (2000). Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science* 288, 113–116.

- Velve-Casquillas, G., Le Berre, M., Piel, M., and Tran, P.T. (2010). Microfluidic tools for cell biological research. *Nano Today* 5, 28–47.
- Wagner, I., Materne, E.-M., Brincker, S., Süssbier, U., Frädrich, C., Busek, M., Sonntag, F., Sakharov, D.A., Trushkin, E.V., Tonevitsky, A.G., *et al.* (2013). A dynamic multi-organ-chip for long-term cultivation and substance testing proven by 3D human liver and skin tissue co-culture. *Lab. Chip* 13, 3538–3547.
- Weigelt, B., Ghajar, C.M., and Bissell, M.J. (2014). The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 0, 42–51.
- Werner, S. (1998). Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9, 153–165.
- Whitesides, G.M. (2006). The origins and the future of microfluidics.
- Widmer, G., and Sullivan, S. (2012). Genomics and population biology of *Cryptosporidium* species. *Parasite Immunol.* 34, 61–71.
- Widmer, G., Akiyoshi, D.E., Buckholt, M.A., Feng, X., Rich, S.M., Deary, K.M., Bowman, C.A., Xu, P., Wang, Y., Wang, X., *et al.* (2000). Animal propagation and genomic survey of a genotype 1 isolate of *Cryptosporidium parvum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 108, 187–197.
- <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/colorectal-cancer-statistics>
- Xiao, L., Morgan, U.M., Fayer, R., Thompson, R.C., and Lal, A.A. (2000). *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. *Parasitol. Today Pers. Ed* 16, 287–292.
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U.M., and Upton, S.J. (2004). *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 72–97.
- Yao, Y., Xu, M., Liang, L., Zhang, H., Xu, R., Feng, Q., Feng, L., Luo, B., and Zeng, Y.-X. (2017). Genome-wide analysis of Epstein-Barr virus identifies variants and genes associated with gastric carcinoma and population structure. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 39, 1010428317714195.
- Yegüez, J.F., Martinez, S.A., Sands, D.R., Sands, L.R., and Hellinger, M.D. (2003). Colorectal malignancies in HIV-positive patients. *Am. Surg.* 69, 981–987.
- Yissachar, N., Zhou, Y., Ung, L., Lai, N.Y., Mohan, J.F., Ehrlicher, A., Weitz, D.A., Kasper, D.L., Chiu, I.M., Mathis, D., *et al.* (2017). An Intestinal Organ Culture System Uncovers a Role for the Nervous System in Microbe-Immune Crosstalk. *Cell* 168, 1135–1148.e12.
- Yoder, J.S., Wallace, R.M., Collier, S.A., Beach, M.J., Hlavsa, M.C., and Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2012). Cryptosporidiosis surveillance--United States, 2009–2010. *Morb. Mortal. Wkly. Rep. Surveill. Summ. Wash. DC* 2002 61, 1–12.
- Yousof, H.-A.S., Khater, M.M., El-Sayed, S.H., and El-Badry, A.A. (2017). Diagnostic biomarkers in murine Cryptosporidiosis: dose- and age-related infection. *J. Parasit. Dis. Off. Organ Indian Soc. Parasitol.* 41, 831–836.

- Zadrozny, L.M., Stauffer, S.H., Armstrong, M.U., Jones, S.L., and Gookin, J.L. (2006). Neutrophils do not mediate the pathophysiological sequelae of *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal piglets. *Infect. Immun.* 74, 5497–5505.
- Zervantonakis, I.K., Hughes-Alford, S.K., Charest, J.L., Condeelis, J.S., Gertler, F.B., and Kamm, R.D. (2012). Three-dimensional microfluidic model for tumor cell intravasation and endothelial barrier function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 13515–13520.
- Zhang, L., Sheoran, A.S., and Widmer, G. (2009). *Cryptosporidium parvum* DNA Replication in Cell-Free Culture. *J. Parasitol.* 95, 1239–1242.
- Zhang, S., Jian, F., Zhao, G., Huang, L., Zhang, L., Ning, C., Wang, R., Qi, M., and Xiao, L. (2012). Chick embryo tracheal organ: a new and effective in vitro culture model for *Cryptosporidium baileyi*. *Vet. Parasitol.* 188, 376–381.
- Zheng, C., Chen, G., Pang, Y., and Huang, Y. (2012). An integrated microfluidic device for long-term culture of isolated single mammalian cells. *Sci. China Chem.* 55, 502–507.
- Zhou, Y. (2017). The recent development and applications of fluidic channels by 3D printing. *J. Biomed. Sci.* 24, 80.
- Zhou, R., Gong, A.-Y., Eischeid, A.N., and Chen, X.-M. (2012). miR-27b targets KSRP to coordinate TLR4-mediated epithelial defense against *Cryptosporidium parvum* infection. *PLoS Pathog.* 8, e1002702.
- Ziegler, L., Grigoryan, S., Yang, I.H., Thakor, N.V., and Goldstein, R.S. (2011). Efficient generation of schwann cells from human embryonic stem cell-derived neurospheres. *Stem Cell Rev.* 7, 394–403.

X. Annexes

Communications orales

✓ **2017 SMMIL-E Workshop on BioMEMS technologies against Cancer**

Martha Baydoun, Sadia Benamrouz Vanneste, Karine Guyot, Nausicaa Gantois, Magali Chabe, Colette Creusy, Pierre Gosset, Baptiste Delaire, Eric Viscogliosi, Vincent Senez, Jérôme Follet and Gabriela Certad.

Development of a low grade neoplasia in a 3D culture model after infection with the intestinal parasite *Cryptosporidium parvum* (présentation orale)

✓ **2017 VI International Crptosporidum and Giadia conference; La havana-Cuba.**

Martha Baydoun, Sadia Benamrouz Vanneste, Karine Guyot, Nausicaa Gantois, Magali Chabe, Colette Creusy, Pierre Gossetn Baptiste Delaire, Vincent Senez, Eric Viscogliosi, Jérôme Follet and Gabriela Certad.

Three-dimensional (3D) culture of adult murine colon as in vitro model for Cryptosporidiosis (présentation orale)

- ✓ **2016.** Carrefour Pathologie 2016, Comité d'interface INSERM / Anatomie et Cytopathologie pathologiques, Palais des Congrès Paris.

Martha Baydoun, Sadia Benamrouz Vanneste, Karine Guyot, Nausicaa Gantois, Magali Chabe, Colette Creusy, Pierre Gosset, Baptiste Delaire, Vincent Senez, Eric Viscogliosi, Jérôme Follet and Gabriela Certad.

Three-dimensional (3D) culture of adult murine colon as in vitro model for Cryptosporidiosis.

- ✓ **2016.** CECED Club d'études des cellules épithéliales digestives.

Martha Baydoun, Sadia Banamrouz Vanneste, Karine Guyot, Nausicaa Gantois, Magali Chabé, Colette Creusy, Pierre Gosset , Baptiste Delaire, Vincent Senez, Eric Viscogliosi, Jérôme Follet and Gabriela Certad.

Three-dimensional (3D) culture of adult murine colon as in vitro model for Cryptosporidiosis (Poster).

- ✓ **2016.** 13th International conference on molecular epidemiology and evolutionary genetics of infectious diseases, Institute of Tropical Medecine, Antwerp, Belgium.

Martha BAYDOUN, Sadia Benamrouz Vaneste, Karine Guyot, Nausicaa Gantois, Magali Chabe, Colette Creusy, Pierre Gosset , Baptiste Delaire, Eric Viscogliosi, Vincent Senez, Jérôme Follet and Gabriela Certad.

Three-dimensional (3D) culture of adult murine colon as in vitro model for Cryptosporidiosis (Poster).

Prix

- ✓ **2017 :** Deuxième prix d'excellence du Conseil de Recherche de l'Université Catholique de Lille.