



HAL
open science

Effet de la paromomycine sur le développement du parasite *Cryptosporidium parvum* : des méthodes standards de détection à la spectroscopie d'impédance, comment accélérer les méthodes de criblage des molécules à visée thérapeutique ?

Anne-Charlotte Lenière

► To cite this version:

Anne-Charlotte Lenière. Effet de la paromomycine sur le développement du parasite *Cryptosporidium parvum* : des méthodes standards de détection à la spectroscopie d'impédance, comment accélérer les méthodes de criblage des molécules à visée thérapeutique?. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université de Lille, 2023. Français. NNT : 2023ULILN007 . tel-04324754

HAL Id: tel-04324754

<https://theses.hal.science/tel-04324754>

Submitted on 5 Dec 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT

École Doctorale ENGYS Sciences de l'ingénierie et des systèmes

Spécialité Micro-Nanosystèmes et Capteurs

Effet de la paromomycine sur le développement du parasite *Cryptosporidium parvum* : des méthodes standards de détection à la spectroscopie d'impédance, comment accélérer les méthodes de criblage des molécules à visée thérapeutique ?

Thèse présentée et soutenue publiquement par

Anne-Charlotte LENIÈRE

Le 6 janvier 2023

Devant le jury d'examen		
Isabelle DUFOUR	Professeure, Université de Bordeaux	Rapporteur
Loïc FAVENNEC	Professeur des Université – Praticien Hospitalier Université de Rouen Normandie	Rapporteur
Abdelkrim TALBI	Professeur, École Centrale de Lille	Président du jury
Karim ADJOU	Professeur, École Nationale Vétérinaire d'Alfort	Examineur
Alexis VLANDAS	Chargé de Recherche CNRS (IEMN), Lille	Examineur
Jérôme FOLLET	Enseignant-Chercheur JUNIA, Lille	Directeur de thèse

RÉSUMÉ

Les parasites du genre *Cryptosporidium* sont les agents pathogènes responsables d'une maladie gastro-entérique marquée par des diarrhées sévères : la cryptosporidiose. Cette infection peut devenir fatale chez les individus les plus fragiles (enfants en bas âge, personnes âgées ou immunodéprimées). Ainsi, bien que présente dans le monde entier indépendamment du niveau de développement économique des pays, la cryptosporidiose a été décrite comme étant la deuxième cause de diarrhée sévère pouvant entraîner la mort chez les enfants âgés de moins de 2 ans en Afrique et en Asie. A ce jour, aucun vaccin ni traitement n'a été mis au point de manière efficace. La recherche de nouvelles molécules thérapeutiques s'est heurtée à l'absence d'outils standardisés et automatisés, limitant l'étude du parasite et la découverte de nouveaux traitements.

Le projet de cette thèse vise donc à développer un microsystème basé sur la spectroscopie d'impédance dédié à l'étude du parasite *Cryptosporidium parvum* et au criblage de molécules thérapeutiques. Dans ce contexte, l'efficacité de la paromomycine (molécule de référence utilisée dans le criblage *in vitro* de molécules contre *C. parvum*) a été déterminée par des méthodes standards (moléculaire et microscopique) afin d'être comparée à la spectroscopie d'impédance.

Pour cela, les cellules HCT-8 issues d'un adénocarcinome iléo-caecal humain ont été infectées par *C. parvum* pendant 48 heures et traitées avec une gamme de concentrations croissantes en paromomycine. L'efficacité de la paromomycine a d'abord été déterminée par la technique de microscopie puis par la méthode moléculaire (qPCR). La quantification du parasite sur les images microscopiques fluorescentes a été réalisée automatiquement en utilisant le plugin *StarDist (Fiji)* et des données morphométriques sur chaque parasite ont été obtenues. De même, les *Concentrations Inhibitrices médianes* de la paromomycine (CI_{50}) ont été obtenues par ces deux méthodes avec des valeurs de 357 μ g/mL et 382 μ g/mL respectivement. L'analyse par spectroscopie d'impédance a permis d'obtenir une réponse caractéristique des cellules infectées dès 12 heures d'infection qui pourrait être utilisée comme un capteur d'infectiosité et représenter une méthode adaptée au criblage de molécules thérapeutiques.

Mots-clés : *Cryptosporidium* ; HCT-8 ; bioimpédance ; paromomycine ; criblage moléculaire *in vitro* ; infectiosité.

SUMMARY

Cryptosporidium is a protozoan parasite which infects a wide range of hosts including Human Beings and has a global presence. *Cryptosporidium* is the etiologic agent of cryptosporidiosis, a disease characterized by profuse diarrhea. In vulnerable patients (infants, old people or immunodeficient persons) the prevalence and severity of infection increases and can result in death. In Africa and Asia, *Cryptosporidium* was identified as the second cause of diarrhea in children under 2 years old. To date no vaccine nor drug therapy is available. Research for new drugs against *Cryptosporidium* therapy has been impeded by the absence of standardized and automated tools enabling the study of the complete *Cryptosporidium* Life cycle and drug screening.

Therefore, this project aims to develop a microsystem based on impedance spectroscopy for the study of *Cryptosporidium parvum* and drugs screening. In this context, the efficacy of paromomycin (the gold standard used in drugs screening against *C. parvum*) was determined by standard methods (molecular and microscopic) to be compared with impedance spectroscopy.

Here, *Human ileocecal colorectal adenocarcinoma cells* (HCT-8) were grown to confluency and infected by *C. parvum* during 48 h with a range of paromomycin concentrations. Results were obtained by fluorescence microscopy and molecular method (real-time qPCR). The level of infection was assessed using fluorescent images combined with an automatic detection of parasites using a *Fiji* plugin (*StarDist*) and morphometric data for each parasite were recorded. The *half maximal inhibitory concentrations* (CI₅₀) of paromomycin were obtained (357 µg/mL and 382 µg/mL respectively). Thus, the new approach using the electrical impedance-based device to quantify infectivity of HCT-8 infected by *C. parvum* showed a characteristic response of infected cells from 12 hours of infection, which could be used as an infectivity sensor, faster than current methods and could represent a suitable method for drug screening.

Keywords: *Cryptosporidium*, HCT-8, impedance spectroscopy, paromomycin, *in vitro* drug screening, infectivity.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse : Isabelle DUFOUR et Loïc FAVENNEC pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je remercie également Karim ADJOU et Abdelkrim TALBI pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie de tout cœur mes encadrants Jérôme FOLLET et Alexis VLANDAS pour m'avoir guidée durant ces trois années de thèse et pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans un environnement aussi interdisciplinaire. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée et tout ce que vous m'avez appris, aussi bien par la complémentarité de vos compétences que par vos qualités personnelles. Enfin, je vous remercie pour le temps que vous avez consacré à la relecture de ce manuscrit et aux corrections apportées.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à Charlène BRILLARD pour la conception et la réalisation des dispositifs. Un grand merci pour tout ce que tu as fait ainsi que pour tes précieux conseils. Je te suis très reconnaissante de m'avoir fait découvrir de nouveaux domaines et je te remercie sincèrement pour m'avoir fait tant apprécier la microscopie (et surtout *Fiji*) !

Je souhaite adresser mes remerciements à tous les membres du projet européen *H4DC* et plus particulièrement à l'équipe spécialisée dans *l'Intelligence Artificielle* : Halim BENHABILES, Feryal WINDAL et Ziheng YANG. De même, je suis reconnaissante envers Anastasios TSAOUSIS (*Université du Kent, Canterbury*) pour m'avoir accueillie dans son laboratoire à l'occasion des expérimentations sur les cellules COLO-680N, ainsi qu'envers son équipe et plus spécifiquement Ruben MARTIN-ESCOLANO et Pedro PINTO.

Je tiens à remercier l'ensemble du groupe *BioMEMS (IEMN, Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie)*, Vincent THOMY pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe ; Céline VIVIEN pour sa sympathie et ses encouragements tout au long de la thèse ; Aude SIVERY pour sa disponibilité, ses explications concernant l'utilisation du microscope *Leica DMI8* et les solutions apportées à chaque difficulté rencontrée dans le laboratoire de biologie L2.

Je remercie le groupe *BioGAP (ISA, Institut Supérieur d'Agriculture - JUNIA)* : Ourida HAMMOUMA pour l'aide apportée à chaque fois que j'avais des manip' à l'ISA et pour m'avoir formée à la *nested PCR*. De même, je remercie Caroline DEWEER pour sa rapidité dans la gestion des nombreuses commandes en lien avec mes expérimentations et qui, pour certaines, ont été très difficiles à obtenir. Du côté des doctorants je souhaite dire merci à Aline LECONTE pour avoir pris le temps de m'expliquer le fonctionnement de la machine et du logiciel *Biorad* nécessaires à la réalisation des qPCR.

Je tiens à remercier très sincèrement Pierre LALY pour sa gentillesse et son aide concernant le dispositif.

J'exprime toute ma sympathie et reconnaissance à ma collègue de bureau Chakrya-Anna CHHUON avec qui j'ai passé de bons moments ainsi qu'à Nathan SCHOONJANS pour son aide, son expertise en capture de fourmis et toutes les conversations en lien avec la biologie.

Un grand merci à mes proches qui m'ont soutenue et encouragée : Mes parents, Valérie, Guitou, Vincent, Béatrice et Victor ! J'ai également une pensée pour la famille PARENT et plus particulièrement pour Michel que je souhaite remercier pour son intérêt vis-à-vis de mes travaux.

Enfin, un immense merci à Florian pour son soutien depuis de nombreuses années maintenant. Je te remercie pour la bienveillance et la patience dont tu as fait preuve durant mon doctorat qui a été une étape importante de ma vie. Je suis ravie de l'avoir partagée avec toi et je te remercie pour ta précieuse relecture du manuscrit !

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Abréviations

Glossaire

Partie 1 : *Cryptosporidium* : un problème de santé publique 2

1.	Généralités	2
1.1	Les symptômes de la cryptosporidiose.....	2
1.2	Épidémiologie de la cryptosporidiose humaine	3
1.3	Épidémiologie de la cryptosporidiose chez les animaux d'élevage : exemple des bovins.....	5
1.4	Transmission du parasite	5
1.5	Cycle de vie de <i>C. parvum</i>	7
1.6	Pathogénicité	9

Partie 2 : Le développement de molécules thérapeutiques contre la cryptosporidiose 11

2.1	Les traitements actuels de la cryptosporidiose	11
2.1.1	La Paromomycine.....	11
2.1.2	Le Nitazoxanide	15
2.1.3	Conclusion.....	17
2.2	Les principaux défis liés au développement de nouvelles molécules contre <i>Cryptosporidium spp.</i>	18
2.2.1	La capacité de résistance du parasite	18
2.2.2	Limitation des modèles <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de développement du parasite	19
2.3	Méthodes de quantification du parasite <i>Cryptosporidium</i>	24
2.3.1	Technique d'imagerie.....	24
2.3.2	Technique CPE, l'effet cytopathique	25
2.3.3	Technique moléculaire	26
2.3.4	Utilisation de souches transgéniques de <i>Cryptosporidium</i>	26

2.4 Sourcer les nouvelles molécules thérapeutiques : où en sommes-nous ?.....	28
2.4.1 Stratégie du criblage de chimiothèques ciblées.....	28
2.4.2 Stratégie du criblage phénotypique (molécules inconnues)	33
2.5 Conclusion.....	35
Partie 3 : La spectroscopie d'impédance	38
3.1 Principe de la spectroscopie d'impédance appliquée aux cellules	39
3.2 Electrodes interdigitées	40
3.3 Domaines d'application.....	41
3.3.3 La spectroscopie d'impédance pour étudier des agents pathogènes.....	46
3.4 Utilisation de la spectroscopie d'impédance dans l'étude de <i>Cryptosporidium</i>	47
Objectifs de l'étude	49
Matériel et Méthodes.....	50
1. Culture cellulaire.....	50
1.1 Les cellules HCT-8.....	50
1.2 Les cellules COLO-680N	50
1.3 Décongélation des cellules	50
1.4 Entretien des cellules – Repiquage.....	50
1.5 Culture des cellules en puits	51
2. Infection des cultures cellulaires par <i>C. parvum</i>	51
2.1 Test de viabilité des oocystes de <i>C. parvum</i>	51
2.2 Protocoles d'infection des cultures cellulaires par <i>C. parvum</i>	51
Préparation des solutions de paromomycine	52
3. Quantification parasitaire par Microscopie.....	53
3.1 Détermination de la Viabilité cellulaire	53
3.2 Marquages immunofluorescents avec des anticorps commerciaux.....	53
3.3 Reconnaissance des formes du cycle de <i>C. parvum</i>	53
3.4 Analyse des images microscopiques par StarDist (plugin Fiji).....	54
4. Quantification parasitaire par <i>real-time</i> qPCR.....	56
4.1 Préparation des échantillons de cellules infectées par <i>C. parvum</i> au format 96 puits.....	56

4.2 Réalisation de la gamme d'oocystes.....	56
4.3 Extraction de l'ADN de <i>C. parvum</i>	56
4.4 Real-time qPCR.....	57
5. Analyse par spectroscopie d'impédance	
5.1 Présentation du prototype 1 électrode	58
5.2 Présentation du dispositif 10 électrodes	59
5.3 Représentation des données.....	60
5.4 Acquisition des données impédimétriques	61
5.5 Lavage des électrodes.....	61
6. Statistiques	61
Résultats – Discussion.....	62
Partie 1 – Choix du modèle cellulaire	62
Conclusion.....	64
Partie 2 – Évaluation de l'efficacité de la paromomycine par des méthodes standards	66
2.1 Évaluation de l'efficacité de la paromomycine par microscopie	66
2.1.1 Détermination de la cytotoxicité de la paromomycine.....	66
2.1.2 Détermination de l'IC ₅₀ par quantification automatique de <i>C. parvum</i> sur la base du plugin <i>StarDist</i> (Fiji)	67
Conclusion.....	71
2.2 – Évaluation de l'efficacité de la paromomycine par analyse moléculaire	74
3 – Évaluation de l'efficacité de la paromomycine par spectroscopie d'impédance.....	76
3.1 Caractérisation du prototype 1 électrode.....	77
3.2 Détermination de la stabilité des réponses électriques du prototype.....	79
3.3 Croissance des cellules HCT-8 dans le prototype	79
3.4 Infection des cellules HCT-8 avec <i>C. parvum</i> dans le prototype	80
4. Utilisation du dispositif 10 puits	81
4.1 Test du dispositif avec de l'EDI et des solutions de PBS.....	81
4.2 Stabilité des mesures impédimétriques dans le dispositif 10 puits.....	82
4.3 Croissances cellulaires dans le dispositif 10 puits.....	83

4.4 Suivi par impédance de l'infection des cellules HCT-8 par <i>C. parvum</i>	85
Perspectives	87
1. Stratégies à court terme : amélioration des techniques	87
1.1 Amélioration du système de détection automatisé des images microscopiques.....	88
1.2 Conception d'un dispositif 96 puits destiné au criblage de molécules.....	88
2. Stratégies à moyen terme	89
2.1 Aspects biologiques liés à <i>C. parvum</i>	89
2.2 Aspects techniques : amélioration du dispositif 96 puits	90
3. Stratégies à long terme : rendre le modèle <i>in vitro</i> le plus proche de l'environnement rencontré <i>in vivo</i>	91
Amélioration de l'environnement <i>in vitro</i> de <i>C. parvum</i>	91
Utilisation du dispositif sur d'autres pathogènes.....	94
Bibliographie	96

Liste des figures

Figure 1 : Distribution mondiale des épidémies d'origine hydrique impliquant des parasites protozoaires. D'après Ma et al.,2022.	7
Figure 2 : Cycle de vie de <i>Cryptosporidium spp.</i> . Modifiée d'après Bouzid et al.,2013.	8
Figure 3 : (A) Pourcentage de la répartition des stades asexués/sexués (Tandel et al.,2019) (B) Modèle de progression du cycle de vie de <i>Cryptosporidium</i> d'après English et al.,2021 avec le passage de la reproduction asexuée à la reproduction sexuée après trois générations de mérontes.	9
Figure 4 : Représentation de l'interface cellule hôte-parasite. Une structure en forme d'anneau « ring » se forme à l'intersection de la membrane plasmique du parasite (PM) et de la membrane de la vacuole parasitophore (PVM). D'après Guérin et Striepen, 2020.	18
Figure 5 : Image reconstituée (3x3 images à faible grossissement) représentant 13% de la surface du puits. Noyau cellulaire (cyan) et de parasite (rouge). Barre d'échelle 100µm.	25
Figure 6 : Effet cytopathique de l'infection par <i>C. parvum</i> des cellules HCT-8. (A) Observations microscopiques (B) quantification de la viabilité cellulaire (rouge) en fonction du nombre d'oocystes par cellule (MOI 0, 0.5, 1, 2 et 4) et (C) effet cytopathique induit par <i>C. parvum</i> en fonction du temps avec traitement Cladosporine (ligne rouge) ou sans traitement (ligne bleue).	26
Figure 7 : Cinq souris KO IFN- γ ont été infectées avec 10 000 parasites transgéniques exprimant la luciférase de luciole (FLuc) et ont été surveillées quotidiennement par imagerie. Sept jours post-infection, les animaux ont été traités avec 10 mg/kg de KDU731 ou avec le vecteur vide (Figure 2g Manjunatha et al.,2017).	27
Figure 8 : Représentation de la configuration TEER.	38
Figure 9 : Passage du courant paracellulaire aux basses fréquences (A) et transcellulaires aux hautes fréquences(B).	39
Figure 10 : Principe de la spectroscopie d'impédance appliquée aux cellules.	40
Figure 11 : Représentation schématique d'une électrode interdigitée de forme droite (A) et arrondie (B).	40
Figure 12 : Impédance normalisée à 60 kHz en fonction du temps mesurée sur des cellules HeLa. Synchronisation des cellules en utilisant la thymidine (CIS1 et CIS2) par rapport aux témoins non synchronisés (CIS3) et sans cellules (CIS4). Les flèches noires indiquent les changements de milieu de culture et les points bleus numérotés font référence aux observations microscopiques (Wang et al.,2010).	41
Figure 13 : Différents profils d'impédance des cellules soumises à l'ostéogénèse, à l'adipogénèse et des cellules non différenciées, à 64 kHz en fonction du temps (Bagnaninchi et Drummond, 2011).	42
Figure 14 : Impédance normalisée (Cell index) en fonction du temps des cellules LUHMES (Lund Human Mesencephalic)ensemencées à 60 000 cellules/cm ² . La prolifération cellulaire est représentée en bleu et la différenciation en rouge (Shah et al.,2021.	42
Figure 15 : Evolution de l'impédance mesurée à 1 kHz, 10 kHz et 100 kHz en fonction du type cellulaire (saines et cancéreuses). Données extraites par Hedayatipour et al.,2019 à partir de l'étude de Han et al.,2007.	43
Figure 16 : Altération de la barrière endothéliale provoquée par la migration de monocytes (Kho et al.,2017).	44
Figure 17 : Détermination de la cytotoxicité de la nicotine par impédance normalisée (NI) et par le test colorimétrique NRU (Neutral Red Uptake) en fonction de concentrations croissantes de Nicotine. ...	46

Figure 18 : (A) Impédance normalisée de la réponse des cellules BHK-1 infectées avec DENV-2 NGC à différents MOI (0, 0.1, 1, 5 et 10) (B) Impédance normalisée de la réponse impédimétrique en fonction de 4 souches du virus de la Dengue. (Cheng et al.,2015).....	47
Figure 19 : Spectre d'amplitude d'impédance des oocystes de <i>C. parvum</i> morts et vivants en suspension dans une solution d'eau PPI (Pré pour Injection) à une concentration de 1000 oocystes/ μ L (Houssin et al.,2010).....	47
Figure 20 : Réponses impédimétriques des cellules HCT-8 infectées par <i>C. parvum</i> . Impédance normalisée à 30kHz pour différents rapports [sporozoïte]:[cellule]. Le témoin négatif 0:1 correspond à des sporozoïtes inactivés par choc thermique (Dibao-Dina et al.,2015).	48
Figure 21 : Phases asexuées et sexuées du cycle de vie de <i>C. parvum</i> . Phases asexuées : trophozoïtes, début d'apparition au temps 8 heures post-infection (barre d'échelle 2 μ m) et mérontes dès 12 h pi jusqu'à 28 h pi (barre d'échelle 4 μ m). Apparition des phases sexuées entre 36 et 40 h pi : gamontes (barre d'échelle 4 μ m). Gx1000.	54
Figure 22 : Reconnaissance des formes par des polygones convexes en étoile.	55
Figure 23 : Interfaces du logiciel Fiji/Image J et du plugin StarDist.	55
Figure 24: Exemple de segmentation avec StarDist. (A) Noyaux cellulaires colorés au DAPI en bleu. (B) Reconnaissance et segmentation des noyaux cellulaires. (C) Masque associé à la segmentation des noyaux cellulaires (Gx200 ; barre d'échelle 20 μ m).....	56
Figure 25 : Réalisation de 3 gammes standards de concentration d'oocystes de <i>C. parvum</i> . Trois expériences indépendantes et chaque point de la gamme a été déposé en triplicata.	58
Figure 26 : Prototype 1 électrode	59
Figure 27 : Dispositif 10 électrodes	59
Figure 28 : Interface du logiciel LabView	61
Figure 29 : Infection des cellules HCT-8 et COLO680N avec <i>C. parvum</i> (Iowa) au temps 48h post-infection (x400). Marquage des oocystes en rouge et des formes intracellulaires du parasite en vert..	62
Figure 30 : 8 jours d'infection des cellules COLO-680N (Gx630 et Gx200). Barre d'échelle 20 μ m. .	63
Figure 31 : Evaluation du taux d'infection de <i>C. parvum</i> par qPCR dans les cellules HCT-8 et COLO-680N en appliquant trois protocoles différents. Les taux d'infection sont exprimés en fonction de l'infection des HCT-8 (protocole I) qui sert de référence.....	64
Figure 32 : Détermination de la cytotoxicité de la paromomycine sur les cellules HCT-8 traitées pendant 48 heures en utilisant le marquage Syto9/PI. (A) Observation microscopique - Barre d'échelle 100 μ m (x400. (B) Pourcentage de viabilité (p<0,05 ; test Mann-Whitney).....	67
Figure 33 : Analyse des cellules infectées par <i>C. parvum</i> en utilisant le plugin StarDist. (A) Image initiale HCT-8 infectées dont les noyaux ont été colorés au Hoechst (bleu), les parasites intracellulaires en vert et les oocystes en rouge. (B) Canal vert isolé. (C) Détection des parasites par StarDist. G x400.....	68
Figure 34 : Efficacité de la paromomycine au temps 48 heures post-infection(A) Somme des aires du parasite <i>C. parvum</i> et (B) nombre de parasites détectés avec le plugin StarDist. 10 images analysées/puits (n=3)moyenne +/- écart-type.....	69
Figure 35 : Détermination de la CI ₅₀ de la paromomycine à 48h post-infection par méthode microscopique.	69
Figure 36 : Efficacité de la paromomycine au temps 72 heures post-infection (A) Somme des aires du parasite <i>C. parvum</i> et (B) : Détermination de la CI ₅₀ de la paromomycine à 72h post-infection par méthode microscopique. 10 images analysées/puits (n=3) Moyenne +/- écart-type.....	70
Figure 37 : Distribution de l'aire des parasites (μ m ²) aux temps 48 heures post-infection (A) et 72 heures post-infection (B) en fonction des doses croissantes de paromomycine. 10 images analysées/puits. Représentation de la moyenne des trois puits avec écart-type.	71

Figure 38 : Comparaison de la détection du modèle initial StarDist avec le nouveau modèle StarDist entraîné à reconnaître les parasites <i>C. parvum</i> . (A) Image initiale de cellules HCT-8 infectées. (B) Canal vert isolé (parasites). (C) Masque généré par le modèle initial StarDist et (D) par le nouveau modèle StarDist entraîné. (E) Segmentation des parasites détectés par le modèle initial StarDist et (F) par le nouveau modèle StarDist entraîné.....	73
Figure 39 : Quantification de <i>C. parvum</i> par PCR quantitative à 48h post-infection en fonction de doses croissantes de Paromomycine (62,5 - 125 - 250 - 500 et 1000 µg/mL). Comparaison avec les cellules infectées pendant 48h sans paromomycine (T48h) et avec les cellules infectées avec des parasites morts (T48h mort). (A) Traitement sans rinçage à 4h post-infection et (B) avec rinçage à 4h post-infection.	75
Figure 40 : Spectres d'impédance de l'eau désionisée (EDI) et d'une gamme de solutions de concentration croissante de PBS (Phosphate Buffer Saline) 0.1X - 1X et 10X enregistrés aux fréquences de 100 Hz à 500 kHz	77
Figure 41 : Diagramme de Bode de l'eau désionisée (EDI) (A) et (B) du PBS enregistré aux fréquences de 100 Hz à 500 kHz.	78
Figure 42 : Détermination de la sensibilité de l'électrode après nettoyage avec de l'EDI.	78
Figure 43 : Stabilité des mesures impédimétriques du milieu de culture RPMI-1640 durant 24 h d'acquisition. (A) Représentation des mesures à différentes fréquences de 500 Hz à 200 kHz. (B) Spectres d'impédance au lancement de l'acquisition (t=0 h) et à 24 h post-acquisition (t=24 h).	79
Figure 44 : Croissances cellulaires des HCT-8. (A) Données brutes à 30 kHz enregistrées pendant 28 h. (B) Quatre croissances cellulaires normalisées enregistrées à 30 kHz pendant 24 h. Les courbes en orange représentent les cellules dont la confluence a été atteinte, la courbe jaune montre les cellules encore en cours de développement et la courbe en vert présente une croissance ralentie des HCT-8..	80
Figure 45 : Réponses impédimétriques normalisées des cellules HCT-8 infectées par <i>C. parvum</i> pendant 24 h en utilisant des électrodes interdigitées de 5 µm. Les courbes en rouges représentent deux expériences indépendantes d'infection ; la courbe en noir représente le milieu de culture et la courbe en bleu fait référence à une infection avec des parasites inactivés par une succession de chocs thermiques.	81
Figure 46 : Spectres d'impédance de l'EDI dans le dispositif 10 puits. (A) Représentation des données brutes pour un puits. (n=3, Moyenne +/- Ecart-type) (B) Normalisation de l'impédance de l'EDI dans les 10 puits.	82
Figure 47 : Spectres d'impédance du PBS 1X enregistrés dans 5 des 10 puits du dispositif. (A) Données brutes et (B) Impédance normalisée à 100Hz.....	82
Figure 48 : Représentation des valeurs d'impédance du milieu de culture dans le dispositif 10 puits aux temps 1 h et 24 h post-acquisition aux fréquences (A) 5kHz ; (B) 10kHz ; (C) 50kHz et (D) 100kHz.	83
Figure 49 : Croissance des cellules COLO680N et HCT-8. (A) Spectre d'impédance des cellules COLO680N aux temps 1h et 24h post-ensemencement ; (B) Observation microscopique des cellules COLO680N à 24h de croissance (Gx400). (C) Spectres d'impédance des cellules HCT-8 aux temps 1h et 24h post-ensemencement. (D) Observation microscopique des cellules HCT-8 à 24h de croissance (Gx400). Les barres en noir représentent les électrodes interdigitées.	84
Figure 50 : Réponses impédimétriques normalisées de la croissance cellulaire des cellules HCT-8 (A) et des cellules COLO680N (B) durant 24 heures à différentes fréquences de 1 kHz à 200 kHz.	85
Figure 51 : Réponses impédimétriques normalisées des cellules HCT-8 infectées pendant 24 h par <i>C. parvum</i> (Iowa) (courbes rouge); les cellules non infectées (gris) et le milieu de culture RPMI-1640 (noir).....	86
Figure 52 : Comparaison des méthodes d'imagerie à fond clair (Bright-field) et à fluorescence pour la visualisation des cellules infectées par <i>C. parvum</i> (Gx630 ; barre d'échelle 20µm).	87
Figure 53 : (A) Paramètres géométriques des électrodes interdigitées (Thèse Alfred Dibao-Dina, 2015) (B) Plaque 48 puits destinée à la conception du dispositif 96 puits.	88

Figure 54 : Croissance des cellules MCF-7 (a) électrodes interdigitées en or (Au) ; ITO et ITO recouvertes d'IrOx. (b) Impédance normalisée après 43 h de croissance en fonction de la fréquence.	91
Figure 55 : Interface Aire-Liquide (ALI). Quantification de la croissance de <i>C. parvum</i> par qPCR dans le système ALI (Wilke et al.,2019).	92
Figure 56 : (a) schéma du microdispositif composé d'une chambre d'hydrogel, de deux réservoirs latéraux destinés au milieu de culture de milieu ainsi qu'un réservoir d'entrée et de sortie pour la perfusion du milieu à travers les tubes formés de cellules. (b) dimensions en μm d'un microcanal. (c) Formation de l'épithélium en fonction du temps visualisée en fond clair (bright-field) (milieu) et en fluorescence en utilisant le marqueur de cellules souches LGR5-eGFP (droite) comparée à la formation d'organoïdes traditionnels (gauche) (Nikolaev et al., 2020).	93
Figure 57 : Visualisation des différents stades de <i>C. parvum</i> après 72 heures d'infection (SEM, barre d'échelle 25 μm) (Nikolaev et al., 2020).	93

Liste des tableaux

Tableau 1 : Utilisation de la paromomycine en modèle <i>in vitro</i> ..	13
Tableau 2 : Molécules thérapeutiques contre la cryptosporidiose.....	36
Tableau 3 : Séquences des amorces et sonde utilisées pour amplifier le gène COWP de <i>C. parvum</i> ...	57
Tableau 4 : Préparation du mélange réactionnel destiné à l'amplification du gène COWP par qPCR.	57
Tableau 5 : Pourcentage de viabilité cellulaire en fonction de doses croissantes de paromomycine....	67
Tableau 6 : Comparaison du pourcentage d'inhibition de <i>C. parvum</i> déterminé par microscopie et par qPCR en fonction de doses croissantes de paromomycine après 48 heures d'infection.	76
Tableau 7 : Comparaison des valeurs d'impédance moyennes du milieu de culture RPMI-1640 en fonction des fréquences après 24 h d'acquisition.	83

Abréviations

Symboles

Ω	Ohm
$ Z(t,f) $	Impédance absolue en fonction du temps et de la fréquence

A

ACS	Acétyl-CoA synthétase
ADN	Acide désoxynucléique
ARN	Acide désoxyribonucléique
ARNr 18S	
ATP	Adénosine Tri Phosphate

B

BALB/c	Modèle de souris néonatales
BFTE	<i>Bovine Fallopian Tube Epithelial Cells</i>
BKI	(<i>Bumped Kinase Inhibitors</i>) inhibiteurs sélectifs des protéines kinases dépendantes du calcium (CDPKs) des agents pathogènes Apicomplexes
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>

C

<i>C. hominis</i>	<i>Cryptosporidium hominis</i>
<i>C. meleagridis</i>	<i>Cryptosporidium meleagridis</i>
<i>C. parvum</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
<i>C.muris</i>	<i>Cryptosporidium muris</i>
Caco-2	Cellules issues d'un adénocarcinome colorectal humain
CDPK	<i>Calcium-Dependant Protein Kinase</i>
CE ₅₀	Concentration Efficace médiane
CHR	Type de souche de <i>C.parvum</i>
CI ₅₀	Concentration Inhibitrice médiane
CNR-LE	Centre National de Référence – Laboratoire Expert
CO ₂	Dioxyde de Carbone
COLO-680N	Cellules cancéreuses œsophagiennes
CPE	Effet cytopathique
CpGPI	Glucose-6-Phosphate Isomérase de <i>Cryptosporidium parvum</i>
CpHK	Hexokinase de <i>Cryptosporidium parvum</i>
CpLDH	Lactate Déshydrogénase de <i>Cryptosporidium parvum</i>
CPSF3	(<i>Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 3</i>)

D

DAPI	(4'-6' diamidino-2-phenylindole) permet de colorer les noyaux cellulaires en bleu
DIC	(Microscopie à) Contraste Interférentiel Différentiel (<i>Differential Interferential Contrast</i>)
DMSO	Diméthylsulfoxyde
E	
ECDC	Centre européen pour la prévention et le contrôle des maladies
ECIS	<i>Electric Cell-substrate Impedance Spectroscopy</i>
EDI	Eau désionisée
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EdU	<i>5-Ethynyl-2'-deoxyuridine</i>
F	
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G	
H	
HBSS	Solution saline équilibrée de Hanks (<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>)
HCS	Imagerie Cellulaire à haut contenu (<i>High Content Screening</i>)
HCT-8	Cellules issues d'un adénocarcinome iléocaecal humain
HDAC	Histones Déacétylases
HeLa	Cellules cancéreuses du col de l'utérus humain
Hz	Hertz
Hpi	Heure post-infection
HT-29	Cellules issues d'un adénocarcinome colorectal humain
I	
IL	<i>Interleukine</i>
IOWA	Type de souche de <i>C. parvum</i>
IMPDH	Inosine 5'-Monophosphate Déshydrogénase
J	
K	
KRS	<i>Lysyl-tRNA Synthetase</i>
L	
M	
MDBK	Cellules non cancéreuses de rein de bovin (<i>Madin-Darby Bovine Kidney</i>)
MDCK	Cellules non cancéreuses de rein de cocker (<i>Madin-Darby Canine Kidney</i>)
MESRI	Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et de l'Innovation
MetRS	<i>Methionyl-tRNA Synthetase</i>

MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
N	
NTZ	Nitazoxanide
NUDE	Type de souris immunodéprimées athymique liée à une modification génétique de type Foxn1 ^{nu/nu}
O	
OGM	Organisme Génétiquement Modifié
P	
PBS	Tampon phosphate salin (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PDMS	Polyméthylsiloxane
PFOR	Pyruvate Ferrédoxine Oxydoréductase
PheRS	<i>Phenyl-tRNA Synthetase</i>
PI	Iodure de propidium (<i>Propidium Iodide</i>)
PI(4)K	<i>Phosphatidylinositol-4-OH kinase</i>
PRM	Paromomycine
Q	
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
qRT-PCR	<i>real-time quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
R	
RPMI-1640	Milieu de culture dans lequel sont cultivées les cellules (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
S	
SCID	Type de souris sévèrement immunodéprimées (<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>)
SIDA	Syndrome d'Immunodéficience Acquise
SVF	Sérum de Veau Foetal
T	
TAMU	Type de souche de <i>Cryptosporidium parvum</i>
TEER	Résistance Électrique TransEpithéliale (<i>TransEpithelial Electrical Resistance</i>)
TU502	Type de souche de <i>Cryptosporidium hominis</i>
U	
UCP	Type de souche de <i>Cryptosporidium parvum</i>
V	
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

Glossaire

Anthropozoonose :	<i>Maladie qui peut être transmise de l'animal vers l'Homme.</i>
Apicomplexes :	<i>(Apicomplexa) eucaryotes unicellulaires parasites d'animaux portant un complexe apical.</i>
Cellules épithéliales :	<i>Cellules spécialisées qui composent l'épithélium (couche de cellules formant la surface de la peau et tapissant des cavités, des glandes et des voies de passage).</i>
Cellules souches :	<i>Cellules indifférenciée capable à la fois de générer des cellules spécialisées dans une fonction particulière et de se maintenir dans l'organisme par division.</i>
Chimiothèque :	<i>Collection de molécules utilisée pour réaliser les criblages moléculaires</i>
Confluence :	<i>Terme de culture cellulaire qui décrit le degré d'écartement qui existe entre cellules adhérentes cultivées en monocouche sur un support approprié</i>
CRISPR/Cas9 :	<i>Outil de modification génétique qui permet de couper l'ADN à un endroit précis. On parle également de « ciseaux moléculaires ».</i>
Cryptes intestinales :	<i>Invaginations des villosités intestinales</i>
Cytosquelette :	<i>Structure filamenteuse de soutien de la cellule formant un squelette intracellulaire</i>
Cytotoxicité :	<i>Propriété d'une substance toxique provoquant des dégâts cellulaires pouvant entraîner la mort de la cellule.</i>
Désenkystement :	<i>Processus consistant à induire la libération des formes infestantes (sporozoïtes) de l'oocyste de <i>Cryptosporidium</i></i>
Différenciation cellulaire :	<i>Processus par lequel une cellule se spécialise en un « type » cellulaire et au cours duquel les cellules vont subir des changements morphologiques importants.</i>
Inoculum/inocula :	<i>Échantillon(s) d'oocystes destiné(s) à être inoculé(s)</i>
Modèle murin :	<i>Modèle utilisant des souris ou des rats</i>
Nano luciférase :	<i>La luciférase est une enzyme dont la réaction va émettre un signal luminescent quantifiable</i>
Oocyste :	<i>Forme de dissémination du parasite <i>Cryptosporidium</i>. Œuf encapsulé des protozoaires Apicomplexes</i>
Porcelets gnotobiotiques :	<i>Porcelets exempts de microbiotes (naissance en condition aseptique et élevage en condition stérile)</i>
Protozoaire :	<i>Eucaryote unicellulaire</i>
Souche :	<i>Variante génétique ou sous-type de l'espèce considérée</i>
Villosités intestinales :	<i>Replis de l'intestin grêle impliqués dans l'absorption des nutriments</i>
Zoonose :	<i>Maladie qui se transmet de l'animal vers l'Homme</i>

État de l'art

Partie 1 : *Cryptosporidium* : un problème de santé publique

1. Généralités

Les cryptosporidies sont des parasites unicellulaires eucaryotes appartenant au genre *Cryptosporidium*. Elles sont les agents étiologiques d'une maladie appelée *Cryptosporidiose*. La première description d'espèce (*C. muris*) a été réalisée par Tyzzer en 1910 sur des coupes d'estomac de souris (Tyzzer 1910) via des observations effectuées en microscopie optique. Par la suite, l'étude de coupes d'intestin murin a permis de décrire une deuxième espèce (*C. parvum*). L'émergence de nouvelles technologies d'imagerie, telle que la microscopie électronique, a permis non seulement de préciser les structures du parasite mais également d'affiner la connaissance des stades de vie de ce dernier. La description de la forme de résistance du parasite, l'oocyste, (Pohlenz 1978) a été un élément clé dans la compréhension des mécanismes de transmission. Par la suite, le développement des outils d'analyses biomoléculaires a été une révolution dans la compréhension de la diversité des espèces et des populations de Cryptosporidies. Ainsi plus d'une quarantaine d'espèces ont été décrites à ce jour.

La progression du champ des connaissances en biologie s'est ainsi construite en parallèle de l'évolution des techniques d'analyse elles-mêmes tributaires de l'apparition d'innovations technologiques.

Les études épidémiologiques menées sur la cryptosporidiose ont mis en évidence que cette maladie représentait un véritable enjeu en termes de sécurité sanitaire et ce, quel que soit le niveau économique du pays. La cryptosporidiose est ainsi présente partout dans le monde et affecte aussi bien les populations humaines que les animaux (qu'ils soient sauvages ou domestiques).

La facilité de propagation de ce pathogène est liée à sa résistance aux conditions environnementales, à son mode de transmission (voie oro-fécale directe ou indirecte), ainsi qu'à l'absence de traitement thérapeutique pleinement efficace. De fait, la gestion des problèmes sanitaires liés aux Cryptosporidies représente donc un véritable défi pour les instances décisionnaires des pays (qu'ils soient industrialisés ou pas).

1.1 Les symptômes de la cryptosporidiose

La cryptosporidiose humaine se caractérise par des symptômes s'apparentant à une gastro-entérite auto-résolutive. Ces symptômes apparaissent après une période d'incubation d'environ 1 semaine (2 à 14 jours) et la diarrhée représente le principal symptôme avec comme conséquence une perte de poids et une déshydratation. D'autres manifestations cliniques telles que des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements et de la fièvre ont été signalées (Chen *et al.*, 2002). Chez un patient immunocompétent, les symptômes disparaissent en moyenne au 12^e jour. Dans les pays à revenus élevés, des effets à longs

termes ont toutefois été recensés (*Stiff et al.,2017*) ; douleurs abdominales persistantes, myalgies, douleurs articulaires récurrentes, fatigue chronique, syndrome du côlon irritable et/ou perte de poids.

Chez les sujets dont le système immunitaire est affaibli ou immature (enfants, personnes âgées ou immunodéprimées) les conséquences de la maladie sont plus importantes. Dans certains cas, des localisations extra-intestinales atypiques ont été signalées (biliaire, respiratoire, pancréatique) (*Lopez-Vélez et al.,1995*). Les travaux de Khalil ont montré que des enfants subissant une forme aigüe de la maladie présentaient sur le long terme des séquelles marquées par des retards de croissance et des altérations de développements cognitifs (*Khalil et al.,2018*). Chez les individus les plus fragiles, la maladie peut présenter une forme chronique conduisant à la mort du patient.

Chez l'animal d'élevage tel que les bovins, les symptômes apparaissent 3 à 4 jours après l'ingestion des oocystes et sont marqués par des diarrhées liquides profuses, une perte d'appétit, une léthargie et une déshydratation conduisant parfois à la mort. Ces symptômes durent généralement moins de 15 jours (*Zambriski et al.,2013*). Il est à noter que chez les bovins, il existe une relation entre l'âge des animaux et les espèces de *Cryptosporidium* identifiées. Ainsi, avant leur sevrage, les veaux sont majoritairement contaminés par l'espèce *C. parvum* et présente le tableau clinique le plus défavorable avec des épisodes diarrhéiques pouvant conduire à la mort des sujets les plus faibles. Après leur sevrage et avant leur première année, les jeunes bovins sont essentiellement infectés par les espèces *C. bovis* et *C. ryanae*. Enfin, les animaux plus âgés sont surtout contaminés par l'espèce *C. andersoni* (*Santin et al.,2004*). Finalement, les travaux menés à l'Institut Pasteur de Lille, ont permis de mettre en évidence la capacité de ce parasite à déclencher dans des modèles murins, des cancers colorectaux invasifs (*Certad et al.,2007*). Cette découverte a apporté un nouveau regard sur l'origine de ce type de cancer particulièrement courant (c'est le quatrième cancer le plus fréquent chez l'homme et le troisième chez la femme).

1.2 Épidémiologie de la cryptosporidiose humaine

À la suite de la première description réalisée par *Tyzzler*, l'intérêt pour les Cryptosporidies s'est atténué reléguant l'étude de ce type d'agent pathogène à un statut « non prioritaire ». Toutefois, l'émergence de l'épidémie de SIDA (*Syndrome d'ImmunoDéfiance Acquise*) dans les années 80 a relancé l'intérêt pour ce parasite qui provoquait des gastro-entérites chroniques chez les patients sidéens pouvant entraîner la mort (*Wang et al.,2018*). Les études menées depuis ont d'ailleurs mis en évidence une prévalence de la cryptosporidiose chez les sidéens à hauteur de 10.9% (*Mekonnen et al.,2016*).

Dans le monde

Les épidémies impliquant l'Homme sont essentiellement dues à deux espèces : *C. hominis* et *C. parvum*. En 2007, il avait été estimé que la cryptosporidiose humaine touchait entre 250 et 500 millions de personnes par an dans le monde (*Snelling, 2007*). En 2020, *Dong et ses collègues* ont réalisé une méta-

analyse sur 69 pays qui a permis d'estimer la prévalence mondiale de la Cryptosporidiose à 7,6%. Le Mexique, le Bangladesh et le Nigeria avaient les prévalences les plus élevées avec 69,6%, 42,5% et 34% respectivement. Les personnes les plus touchées appartenaient aux pays à faibles revenus, souffrant de troubles gastro-intestinaux et situés dans les zones rurales.

De même, *les travaux de Kotloff (2013)* ont mis en évidence l'implication des cryptosporidies dans les cas de diarrhées infantiles chez des enfants âgés de moins de 5 ans en Afrique subsaharienne et en Asie du Sud Est, avec un risque de mortalité significativement accru (8,5 fois) chez les enfants malades. Les auteurs ont également mis en évidence que *Cryptosporidium* représentait la seconde cause de mortalité (après les Rotavirus) par diarrhées chez les enfants âgés de moins de 2 ans. Ainsi, si l'on considère dans le monde que les diarrhées sont responsables de 10.5 % des 7.6 millions de décès chez les enfants de moins de 5 ans (*Liu et al.,2012*), la cryptosporidiose pourrait être responsable d'une part significative de ces décès d'enfants jusqu'à 800 000 cas par an.

En Europe

D'après le *Centre européen pour la prévention et le contrôle des maladies* (ECDC) qui centralise les données épidémiologiques de 20 pays européens pour les cas de cryptosporidiose humaine, 14 299 cas ont été rapportés en 2021 (*ECDC,2021*). L'Allemagne, les Pays-Bas, l'Espagne et le Royaume-Uni représentaient 76% des cas recensés dont 41% uniquement par le Royaume-Uni. En effet, le Royaume-Uni et l'Irlande figurent parmi les principaux rapporteurs et ceci résulte du fait que la déclaration de la maladie y est obligatoire. De même, ces données montrent une saisonnalité de la cryptosporidiose en Europe avec une augmentation des cas signalés à la fin du printemps jusqu'au début de l'automne (*Caccio et Chalmers, 2016*). Au Royaume-Uni le premier pic signalé en fin de printemps a été attribué à *C. parvum* et pourrait être corrélé à une contamination de l'environnement lors de la période de naissance des animaux d'élevage (essentiellement les bovins) alors que le second pic en début d'automne est principalement dû à *C. hominis* et serait attribué à une contamination des eaux récréatives (piscine, lacs, étangs, rivières).

En France

En France, très peu de cas de cryptosporidiose ont été déclarés avant 2017, date de création du *CNR-LE* (*Centre National de Référence – Laboratoire Expert*) de Rouen. De 2017 à 2019, 750 cas de cryptosporidiose ont été signalés au CNR-LE.

En France, la cryptosporidiose n'est pas une maladie à déclaration obligatoire, c'est donc une pathologie sous-diagnostiquée et sous-estimée. Entre 2017 et 2020, 11 épidémies ont été recensées contre 6 depuis 1998 (*Beaudeau et al.,2008 ; Dalle et al.,2003 ; Mosnier et al.,2018*). La région PACA a récemment été impactée par une épidémie d'origine hydrique survenue à Grasse en 2019 en raison de fortes précipitations ayant contaminées le réseau d'eau potable. Il s'agit de la plus grande épidémie de

Cryptosporidium jamais observée en France avec une centaine de cas réévalués. Néanmoins, le nombre précis de cas s'élèverait plutôt à plusieurs milliers (*Costa et al.,2022*).

Les cas de cryptosporidiose ont été signalés tout au long de l'année avec une prédominance à la fin de l'été et notamment chez les enfants âgés de moins de 5 et chez les jeunes adultes (*Costa et al.,2020*)

1.3 Épidémiologie de la cryptosporidiose chez les animaux d'élevage : exemple des bovins

La cryptosporidiose est non seulement un problème de santé publique pour l'Homme, mais c'est également un véritable défi sanitaire dans les élevages. En effet, cette parasitose est responsable de baisses de rendements conséquentes dans les élevages d'animaux de rente tels que les bovins, les ovins, les porcins ou les caprins. Ces pertes de productivité pouvant s'élever à plus de 10% dans les élevages (*De Graaf et al.,1999*) sont la conséquence d'une perte de croissance, de la diminution du taux de conversion des aliments, d'une réduction de la prise de poids et la mort des animaux les plus faibles (*Ralston et al.,2010 ; Bueno da silva et al.,2019*).

Les jeunes bovins essentiellement infectés par l'espèce *C. parvum* sont souvent considérés comme des réservoirs de parasites contaminant l'environnement. En effet, un animal malade peut libérer dans sa matière fécale plusieurs centaines de millions de parasites par jour (*Nydam et al.,2002*). La modélisation réalisée par l'équipe de Vermeulen suggère ainsi que l'excrétion globale des Cryptosporidies serait de l'ordre de $3.2 \cdot 10^{23}$ oocystes par an (*Vermeulen et al.,2017*) avec un rôle prépondérant des bovins dans la contamination de l'environnement humain.

En fonction des pays, la prévalence de *C. parvum* chez les veaux non sevrés varie de 3.4% à 96.6% (*Santín, et al.,2004 ; Santín et al.,2008 ; Thomson, et al.,2017*). Les travaux de Santin suggèrent notamment que lors de leurs premières semaines de vie, la quasi-totalité des veaux en élevage seraient infectés par *Cryptosporidium* (*Santín et al.,2008*).

1.4 Transmission du parasite

Certaines espèces de *Cryptosporidium* présentent un spectre d'hôtes large (i.e. *C. parvum*). En conséquence, la transmission des cryptosporidies peut se faire de l'Homme vers l'Homme, de l'Homme vers l'animal (*Anthropozoonose*), de l'animal vers l'Homme (*Zoonose*) ou de l'animal à l'animal. Dans tous les cas, la transmission et l'infection se fait par voie oro-fécale qui conduit à l'ingestion de la forme de résistance du parasite : l'oocyste. Ce dernier est excrété dans la matière fécale des patients (même asymptomatiques) et contamine l'environnement, l'eau ou les aliments.

Il existe alors deux modes de transmission des cryptosporidies : la voie directe et la voie indirecte. La voie de transmission directe se fait par un contact avec des personnes ou des animaux infectés. Ce mode de transmission a par exemple été décrit chez des vétérinaires travaillant au contact de veaux contaminés (*Preiser et al.,2003*). Toutefois, la voie principale de transmission demeure la voie indirecte. Elle se

traduit par l'ingestion d'aliments (*Ryan et al., 2018 ; Ursini et al., 2020*) ou d'eau (*Chalmers 2012*) contaminés par des oocystes de *Cryptosporidium*. De nombreux aliments ont été à l'origine d'épidémies de cryptosporidiose : des fruits, des légumes, du cidre, du lait pasteurisé, des fruits de mer et de la viande crue pour n'en citer que quelques-uns. En France, le Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation a pris en compte la problématique liée au parasite *Cryptosporidium* dans les aliments en créant notamment l'Unité Mixte Technologique (UMT) Protorisk qui a pour objectif la « *Caractérisation et maîtrise de la contamination des aliments par les parasites protozoaires Cryptosporidium spp., Giardia duodenalis et Toxoplasma gondii* ». Toutefois, c'est la voie hydrique qui demeure le mode de transmission prépondérant des cryptosporidies. Elle inclut aussi bien les eaux récréatives que les eaux de boisson. Il est à noter que la plus importante épidémie de cryptosporidiose d'origine hydrique a été décrite en 1993 dans la ville de Milwaukee (Wisconsin., USA) avec plus de 403 000 personnes infectées et une centaine de morts (*Mac Kenzie et al., 1994*).

La prépondérance de la transmission des cryptosporidies par la voie hydrique s'explique par leur capacité à rester viable et infectieux plus de 16 mois dans des réservoirs d'eau et à leur forte résistance aux agents chlorés couramment utilisés dans le traitement de l'eau.

L'étude de *Ma et ses collègues (2022)* a également montré que *Cryptosporidium* était le principal parasite impliqué dans les épidémies à protozoaires d'origine hydrique (*Figure 1*). En effet, parmi les 251 épidémies recensées de 2017 à 2020 dans le monde, *Cryptosporidium* était impliqué dans 192 épidémies, soit 76,5% des cas.

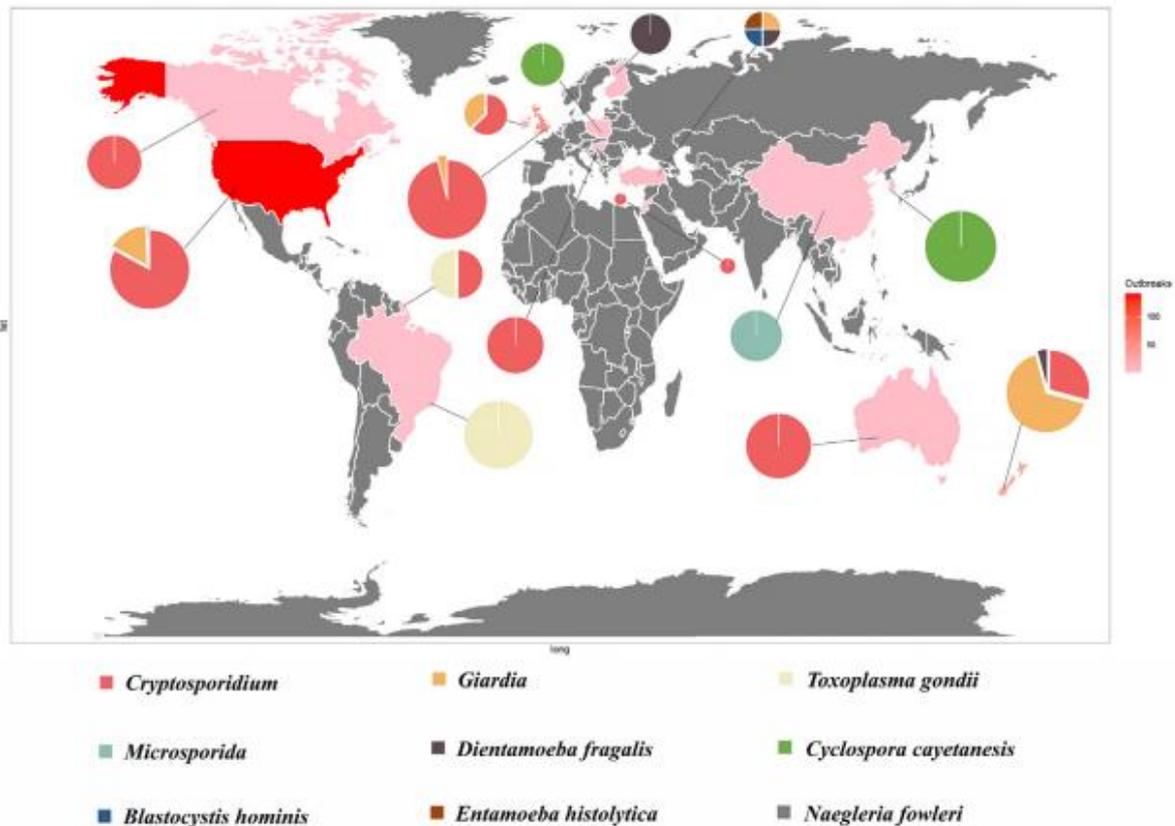


Figure 1 : Distribution mondiale des épidémies d'origine hydrique impliquant des parasites protozoaires. D'après Ma et al.,2022.

Ce constat met notamment en évidence le problème de l'accès à l'eau potable dans le monde et la difficulté de traiter les eaux contre les protozoaires parasites pour les rendre propres à la consommation humaine.

1.5 Cycle de vie de *C. parvum*

Le cycle de vie se déroule chez un seul hôte (*cycle monoxène*), dans les cellules épithéliales de l'intestin grêle ou de l'estomac. Ce cycle de vie demeure complexe et comporte plusieurs phases de reproduction asexuée et sexuée conduisant à différents stades de développement (*Figure 2*). En effet, après l'ingestion des oocystes, quatre sporozoïtes sont libérés sous l'action des enzymes pancréatiques et de la bile (étape de *désenkystement*). Une fois libérés, les sporozoïtes vont infecter les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal. Lors de l'invasion de la cellule hôte, le sporozoïte va être internalisé par la cellule hôte et former une niche appelée « *vacuole parasitophore* » qui confère au parasite sa localisation intracellulaire mais extra-cytoplasmique. À la suite de cette phase de pénétration, le sporozoïte va se transformer en trophozoïte qui va continuer son développement par une série de réplifications asexuées (= *mérogonie*), le trophozoïte va se développer en méronte de type I contenant huit mérozoïtes, (= *stades motiles similaires aux sporozoïtes*) responsables de la réinfection et de la propagation de l'infection aux cellules adjacentes. Ces mérozoïtes libérés vont soit former de nouveaux mérontes de types I soit

conduire au développement des formes impliquées dans la reproduction sexuée du parasite. Dans ce cas, il se crée deux types de structures : des macrogamontes (Femelles) caractérisés par un large noyau excentrique ou des microgamontes (Mâles) possédant 16 petits noyaux à l'origine de la formation de 16 microgamètes. A noter que le stade prolifératif appelé « *Méronte de Type II* », auparavant considéré comme nécessaire à la formation des stades sexués a récemment été démontré comme absent du cycle de vie de *C. parvum*. En effet, *l'équipe de Striepen (2021)* a démontré qu'il existait un développement direct des gamètes à partir du méronte de type I. Enfin, la fécondation qui correspond à la rencontre des microgamètes (M) et des macrogamètes (F), deux types d'oocystes vont être formés : des oocystes à paroi fine, dédiés à la réinfection de l'hôte et des oocystes à paroi épaisse conférant une plus grande résistance à l'environnement et qui seront excrétés dans les matières fécales.

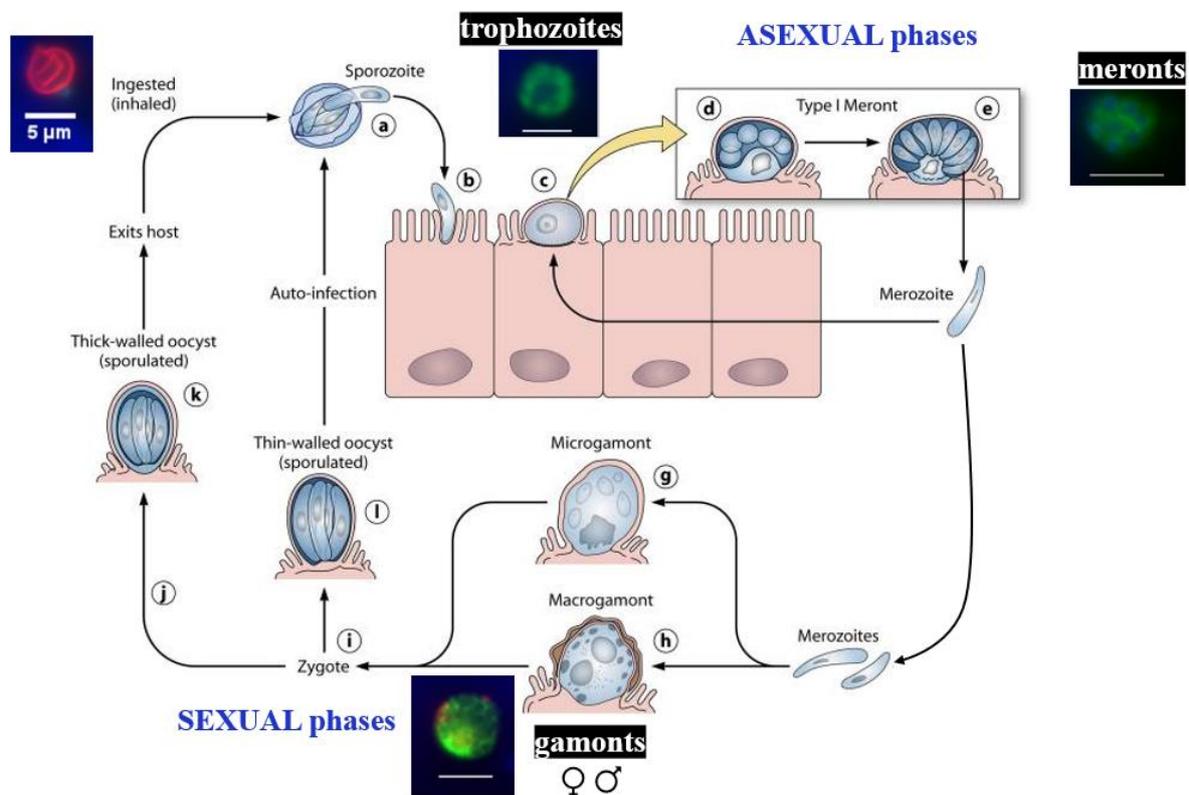


Figure 2 : Cycle de vie de *Cryptosporidium* spp. Modifiée d'après Bouzid et al.,2013.

Des études récentes utilisant la microscopie par immunofluorescence sur des cultures infectées avec des souches de *C. parvum* modifiées génétiquement ont permis de mieux comprendre le déroulement du cycle de vie. Ainsi, les stades asexués ont été signalés comme étant prédominants jusqu'à 36 h d'infection avant de laisser place au développement des stades sexués. En effet, au temps 36 h post-infection, les microgamontes (M) commencent à émerger suivis des macrogamontes (F) pour atteindre un pic à 48 h post-infection (Figure 3A) (Tandel et al.,2019 ; Funkhouser-Jones et al.,2020). A ce jour, les mécanismes impliqués dans la gamétogénèse demeurent inconnus. Aucun signal particulier n'a été détecté dans le milieu de culture mais il a été remarqué que la succession des différents stades était

dépendante du temps. Ainsi, trois intervalles d'environ 12 heures correspondent à la réplication asexuée suivis d'une seule génération de gamètes (*Figure 3B*) (*English et al.,2022*).

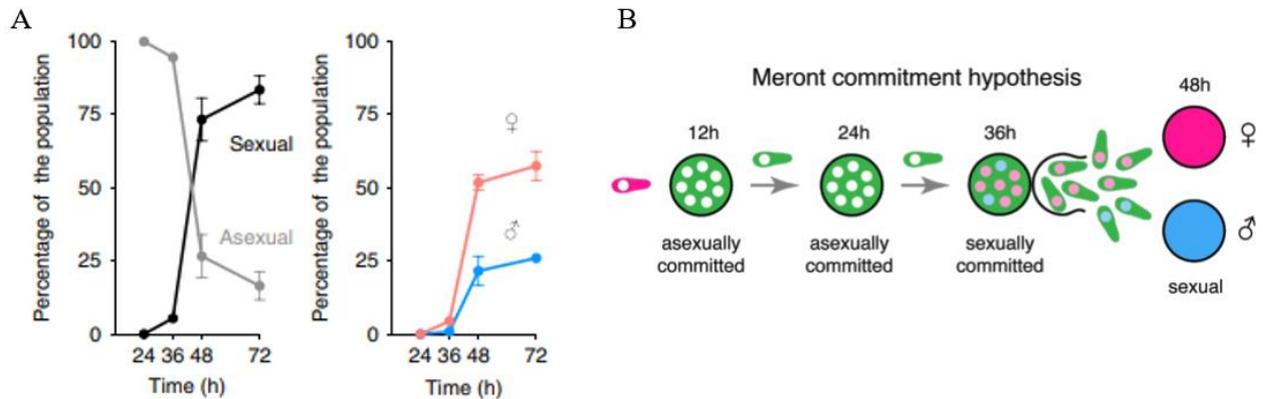


Figure 3 : (A) Pourcentage de la répartition des stades asexués/sexués (*Tandel et al.,2019*) (B) Modèle de progression du cycle de vie de *Cryptosporidium* d'après *English et al.,2021* avec le passage de la reproduction asexuée à la reproduction sexuée après trois générations de mérontes.

1.6 Pathogénicité

La pathogénicité de *Cryptosporidium* se caractérise par sa capacité à provoquer des dommages chez l'hôte qui conduiront à l'apparition des symptômes liés à la maladie. La virulence quant à elle, fait référence à l'intensité de ces dommages qui dépendent de l'interaction hôte-parasite et notamment, de la sensibilité et de la résistance de l'hôte face à ces dommages (*Bouzig et al.,2013*). La virulence est également dépendante de l'espèce et de la souche de cryptosporidies considérée. En effet, certaines espèces peuvent infecter leur hôte sans provoquer l'apparition de signes cliniques (*i.e. C. ryanae* provoque peu voire pas de symptômes chez les vaches adultes). Les différences de virulence s'observent également en fonction des souches de *Cryptosporidium* employées. Ainsi, même si les études menées sur des humains ont mis en évidence que 50% des volontaires étaient infectés après l'ingestion uniquement de 10 à 83 oocystes de *C. hominis*, la dose infectieuse des *inocula* varie pour l'espèce *C. parvum* en fonction des souches utilisées. Ainsi, 9 oocystes de la souche TAMU suffisent à créer une infestation quand 1042 oocystes sont nécessaires pour obtenir les mêmes effets dans le cas de la souche UCP (*Okhuysen, et al.,1999 ; Guyot et al.,2012*).

La pathogénèse de la cryptosporidiose commence dès la fixation du parasite aux cellules du tractus gastro-intestinal. L'invasion du parasite va altérer la fonction de la barrière intestinale en augmentant la perméabilité paracellulaire due à une perte des jonctions cellule-cellule et au réarrangement du cytosquelette qui va notamment subir un remaniement des filaments d'actine au niveau du site d'infection (*O'Hara et Chen, 2011 ; Chen et LaRusso, 2000*). L'infection va également induire des lésions cellulaires qui conduiront à la mort des cellules. Plusieurs études ont démontré que

Cryptosporidium était capable de moduler l'apoptose des cellules hôtes en inhibant ce processus en début d'infection mais en l'activant aux stades plus avancés (Mele et al.,2004). Toutes ces anomalies auront comme conséquences une malabsorption des nutriments ainsi qu'un déséquilibre des sécrétions et seront marquées histologiquement par une atrophie villositaire et une hyperplasie des cryptes en raison du renouvellement des cellules endommagées (Hunter et Nichols, 2002).

Différents facteurs vont être liés à la gravité des symptômes tels que la dose infectante. Chez des volontaires sains, une dizaine d'oocystes de *C. parvum* suffit à provoquer l'apparition des symptômes (Chappell et al.,2006). D'autres facteurs comme l'espèce et la souche de *Cryptosporidium* ; l'âge de l'hôte, son état nutritionnel et son statut immunitaire, seront impliqués dans la gravité des symptômes. La prévalence la plus élevée se trouve chez les jeunes enfants, probablement en raison d'un système immunitaire peu mature ; ou encore, la co-infection avec d'autres entéro-pathogènes (Certad et al.,2017). Une étude réalisée au Pérou chez des individus immunodéprimés a montré l'existence d'une corrélation entre les différentes espèces et souches de *Cryptosporidium* avec les manifestations cliniques (Cama et al.,2007). Notamment, les infections par *C. hominis* (sous-type Id), *C. parvum*, *C. canis* ou *C. felis* étaient caractérisées par une diarrhée chronique. Au contraire de *C. meleagridis* et des sous-types Ia, Ib et Ic de *C. hominis* qui n'ont pas été associés aux symptômes diarrhéiques. Les personnes infectées par *C. parvum* ou *C. hominis* étaient plus susceptibles d'excréter des niveaux plus élevés que les personnes infectées par *C. meleagridis*. De même, *C. hominis* a le plus souvent été associé à des douleurs articulaires et oculaires, des céphalées et de la fatigue (Hunter et al.,2004).

Plus récemment, *Cryptosporidium* serait impliqué dans le développement de cancers dont certains isolats plus virulents, sont capables d'induire des néoplasies (45 jours pour la souche IOWA de *C. parvum* contre 15 jours pour l'isolat CHR). Par analyse génomique comparative des souches cancérogènes de *C. parvum*, les auteurs ont identifiés 125 mutations de type *SNV* (*Single Nucleotide Polymorphism*) impactant 90 gènes du génome de *C. parvum*. Parmi ces gènes, la moitié codait pour des protéines membranaires sécrétées ou impliquées dans le remodelage du cytosquelette. Plusieurs familles de gènes avaient déjà été identifiées comme étant impliquées dans la virulence du parasite, telles que les mucines impliquées dans l'invasion des sporozoïtes, les transporteurs ABC connus pour être impliqués dans le phénomène de résistance et des protéases à cystéine. Parmi les nouveaux facteurs identifiés on trouve plusieurs phosphatases ainsi qu'une lysine méthyltransférase (Audebert et al.,2020).

Partie 2 : Le développement de molécules thérapeutiques contre la cryptosporidiose

A ce jour, les traitements antiparasitaires de la cryptosporidiose sont très limités et aucun vaccin n'a encore été mis au point. Le seul traitement approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) destiné à la cryptosporidiose est le nitazoxanide mais son utilisation se limite aux individus immunocompétents et chez les enfants âgés d'au moins un an. Cependant, l'efficacité du nitazoxanide demeure très limitée dans les populations les plus à risque d'être infectées par *Cryptosporidium* (enfants âgés de moins de 5 ans, les enfants malnutris et les personnes immunodéprimées). Plusieurs molécules thérapeutiques ont été testées dont divers antibiotiques (Paromomycine, Azithromycine, Roxithromycine, Spiramycine) mais l'amélioration des signes cliniques de la cryptosporidiose demeurait insuffisante.

Comme il sera présenté dans les prochains paragraphes, différentes stratégies sont mises en place pour découvrir de nouveaux composés thérapeutiques contre la cryptosporidiose. La caractérisation de ces nouvelles molécules est particulièrement compliquée car les outils standardisés d'étude *in vitro* sont manquants dans l'arsenal technologique mis à la disposition de l'expérimentateur. Ceci s'explique principalement par la difficulté de maîtriser le cycle de reproduction complexe du parasite dans les modèles *in vitro* ce qui limite la progression vers la découverte de nouveaux traitements. De plus, lorsque des molécules telles que le *Nitazoxanide* ou la *Paromomycine* présentent des résultats cellulaires *in vitro* prometteurs, les données obtenues en modèle *in vivo* font l'objet de variabilités en fonction des modèles animaux utilisés. Finalement, les résultats obtenus chez l'Homme présentent également de grandes variabilités qui peuvent être liées soit à un contexte de co-infection parasitaire, soit à des déficiences du système immunitaire.

2.1 Les traitements actuels de la cryptosporidiose

2.1.1 La Paromomycine

La *Paromomycine* (PRM) est un antibiotique aminoside qui cible la synthèse protéique. Il s'agit de la première molécule testée chez l'Homme dans le traitement des diarrhées causées par la cryptosporidiose.

Utilisation de la paromomycine en modèle *in vitro* et *in vivo*

Le tableau ci-dessous synthétise quelques études réalisées en modèle *in vitro* afin d'évaluer l'efficacité de la PRM (*tableau 1*). Ces résultats démontrent l'activité anticryptosporidienne dose-dépendante de la PRM dans divers types cellulaires (*HT29 Human Colorectal Adenocarcinoma Cells* ; *BFTE Bovine Fallopian Tube Epithelial Cells* ; *Caco-2 Human Colonic Adenocarcinoma Cells* ; *HCT-8 Human Ileocecal Adenocarcinoma Cells* et *MDCK Madin-Darby Canine Kidney Cells*) et des réponses variables en fonction de la durée du traitement (expositions de 24 à 96 h). Il est à noter qu'un effet inhibiteur plus important a lieu au cours de la période 48-96 h (*Forney et al.,1997*). Aucun effet

protecteur n'a été toutefois démontré lorsque les cellules ont été pré-incubées en présence de PRM avant l'infection. L'effet inhibiteur s'observe lorsque les parasites ont été pré-incubés en présence de 500 µg/mL de PRM durant 24h avant l'infection des cellules HCT-8 et Caco-2 avec une réduction des formes intracellulaires de 99,5% et 97,2% respectivement (*Mammeri et al., 2018*). En ce qui concerne la mesure de la *Concentration Inhibitrice médiane* (CI₅₀) qui indique la concentration à laquelle la paromomycine est capable d'inhiber 50% du développement du parasite, les résultats sont également divergents en fonction des études. Cette hétérogénéité des résultats peut s'expliquer par les différentes méthodes de quantification des parasites (microscopie, colorimétrie, analyse génétique), le modèle cellulaire, la souche de *C. parvum* considérée, le nombre d'oocystes (taille de l'inoculum) utilisés ainsi que par les différents temps d'application de la PRM. Toutefois, la confirmation de son efficacité observée malgré l'utilisation de divers protocoles justifie l'utilisation de la PRM comme molécule de référence. En effet, ce composé est souvent utilisé comme témoin dans les études menées *in vitro* pour caractériser l'activité anti-cryptosporidies de nouvelles molécules.

Modèle Cellulaire	Souche <i>C. parvum</i>	Résultats	Méthode	Réf
HT-29	Non renseignée	(24h) Inhibition > 85% à 5000 µg/mL	Microscopique (<i>Bright-field</i>)	1
MDCK	IOWA	CI ₅₀ (48h) de 92,3 µM (57 µg/mL) et 133,5µM (82 µg/mL)	Chimioluminescence Microscopique (fluorescence)	2
BFTE	IOWA	Effet dose dépendant : CI ₅₀ (24 h) de 272,7 µg/mL CI ₅₀ (48 h) 128,2 µg/mL CI ₅₀ (72h) 80,6 µg/mL CI ₅₀ (96 h) 73,4 µg/mL	Microscopique (<i>Bright-field</i>)	3
Caco-2	KSU-1	CI ₅₀ (48h) de 85 µM Inhibition maximale de 55% à 400 µM	Microscopique (Fluorescence)	4
MDCK	IOWA	EC ₅₀ (48h) de 1184 µg/mL	Chimioluminescence	5
MDBK	GCH1	(48h) Inhibition de 68% à 250 µg/mL ; 72% à 500 µg/mL 79% à 1000 µg/mL 82% à 2000 µg/mL	Microscopique (Fluorescence)	6
HCT-8	IOWA	(48h) Inhibition de 38% à 200µg/mL 60% à 1000 µg/mL	Immuno-dosage	7
HCT-8	IOWA KSU-1	CI ₅₀ (48h) (77,5 µg/mL) (IOWA) 166µM (102,2 µg/mL) (KSU) 95% d'inhibition à 810 µg/ml	Moléculaire (qRT-PCR)	8
HCT-8	IOWA	CI ₅₀ (48h) de 711 µM (437,7 µg/mL)	Immuno-dosage (ELISA)	9
HCT-8	IOWA	CI ₅₀ (48h) de 10 µg/mL	Immuno-dosage (ELISA)	10
HCT-8	Génotype IIaA15G2R1	EC ₅₀ de 69,5µM soit 42,7 µg/mL	Moléculaire (qPCR)	11

HCT-8	IOWA	CI ₅₀ (48h) de 123 µM soit 75,7 µg/mL	Moléculaire (qRT-PCR)	12
HCT-8	AUCP-1	CI ₅₀ (48h) de 450 µM soit 277 µg/mL CI ₅₀ (72h) de 400 µM soit 246 µg/mL	Microscopique (Fluorescence)	13
HCT-8	MD	64,5% d'inhibition à 1000 µg/mL 88,2% à 2000µg/mL	Microscopie (Fluorescence) Moléculaire (qRT-PCR)	14

Tableau 1 : Utilisation de la paromomycine en modèle *in vitro*. [1] Marshall et Flanigan, 1992 ; [2] You et al.,1996 ; [3] Forney et al.,1997 ; [4] Perkins et al.,1998 ; [5] You et al.,1998 ; [6] Theodos et al.,1998 ; [7] Hommer et al.,2003 ; [8] Cai et al.,2005 ; [9] Downey et al.,2008 ; [10] Graczyk et al.,2011 ; [11] Schupfner et al.,2013] ; [12] Zhang and Zhu, 2015 ; [13] Li et al.,2019 ; [14] Shahiduzzaman et al.,2020.

En modèle *in vivo*, les efficacités prophylactiques et thérapeutiques de la PRM ont été évaluées dans plusieurs modèles animaux tels que des souris immunodéficientes, des veaux, des chèvres, des agneaux et des porcelets gnotobiotiques (exempts de microbiotes).

En 1993, les études de *Fayer et Ellis* réalisées chez la souris et le veau ont montré une efficacité prophylactique de la PRM. En effet, l'administration quotidienne à des souris immunodéficientes BALB/c de 200 mg/kg/j de PRM pendant 72h en commençant une heure avant l'inoculation de 15.10^4 oocystes de *C. parvum* a permis de réduire la charge parasitaire quantifiée dans des coupes histologiques d'intestin. Chez le veau, 100 mg/kg/j administrés pendant 10 jours consécutifs en commençant 24h avant l'inoculation de $1,5 - 2.10^6$ oocystes de *C. parvum* ont empêché l'excrétion des oocystes et ont réduit la sévérité des symptômes diarrhéiques. En revanche, des doses inférieures à 100 mg/kg/j (25 et 50 mg/kg/j) n'ont pas été suffisantes pour obtenir un effet significatif de la PRM.

Une étude réalisée en double aveugle par *Grinberg et son équipe (2002)* chez des veaux a évalué l'efficacité prophylactique de la paromomycine (100 mg/kg/j) administrée dès la naissance pendant 10 jours. L'excrétion des oocystes a été visualisée à la fois dans le groupe traité à la PRM et dans le groupe contrôle sans traitement mais l'excrétion a été retardée chez les veaux ayant reçu le traitement. Les veaux témoins ont commencé à excréter des oocystes au 7^e jour et tous les veaux étaient positifs au 13^e jour. Or chez les veaux traités, l'excrétion est apparue au 11^e jour, soit deux jours après la fin du traitement et tous les veaux traités étaient positifs au 21^e jour. Finalement, les veaux traités ont commencé à excréter des oocystes et développer des symptômes diarrhéiques uniquement après l'arrêt du traitement et la sévérité des symptômes diarrhéiques étaient moins importante que dans le groupe contrôle.

De même, l'administration quotidienne de PRM à 100 mg/kg pendant 21 jours à compter de la naissance présente une action prophylactique chez des chèvres naturellement infectées lors d'une épidémie de cryptosporidiose (*Johnson et al.,2000*). La même dose a été efficace chez des chevreaux (*Mancassola et al.,1995*) et chez des agneaux infectés expérimentalement (*Viu et al.,2000*). Ces études montrent une

diminution de l'excrétion des oocystes et une réduction de la gravité des symptômes cliniques. En d'autres termes l'utilisation de la PRM comme outil de traitement préventif de la cryptosporidiose n'a pas montré une efficacité absolue. Les animaux se sont tout de même retrouvés contaminés, mais les signes cliniques observés étaient quantitativement moins importants.

En ce qui concerne l'aspect thérapeutique de la PRM, *Healey et ses collègues (1995)* ont évalué son efficacité à différentes doses (250, 500, 1000 et 2000 mg/kg/j) pendant 10 jours chez des souris immunodéprimées par un traitement à la dexaméthasone à partir du 7^e jour d'infection. En 24h de traitement, l'excrétion d'oocystes a fortement diminué de façon dose-dépendante mais une rechute a été observée au 14^e jour pour les doses inférieures à 1000 mg/kg/j. Les auteurs ont conclu que des doses comprises entre 1000-2000 mg/kg/j pendant 10 jours consécutifs permettaient de réduire l'infection à *C. parvum*. En revanche, la clairance parasitaire n'a pas été obtenue à la fin du traitement, même à la dose la plus forte. Ce résultat a également été observé par *Verdon et ses collègues (1994)* chez des rats immunodéprimés par dexaméthasone. Chez des porcelets gnotobiotiques nouveau-nés ayant reçu 500 mg/kg/j de PRM à partir du 3^e jour post-infection pendant 10 jours, l'excrétion d'oocystes a rapidement chuté au 7^e jour et les diarrhées ont complètement cessé chez 7 porcelets sur 10. En revanche, des coupes histologiques intestinales ont montré que le parasite n'avait pas été totalement éliminé au 13^e jour d'expérience (*Theodos et al., 1998*).

Utilisation de la paromomycine chez l'Homme

Chez l'Homme, la PRM a fait l'objet de plusieurs études cliniques n'incluant pas l'utilisation d'un placebo et ces études ont été effectuées sur un très petit nombre de patients immunodéprimés. Malgré une efficacité sur l'excrétion des oocystes et sur les symptômes diarrhéiques, plusieurs cas de rechute ont été signalés après l'arrêt du traitement (*Clezy et al., 1991 ; Wallace et al., 1993 ; Bissuel et al., 1994*). De même, une méta-analyse réalisée sur plusieurs études de 1990 à 1996 chez des patients immunodéprimés a montré que la PRM était partiellement efficace (*Abubakar et al., 2007*). Seules deux études réalisées en double aveugle et contrôlées par placebo ont été menées avec des résultats contradictoires : *White et son équipe (1994)* ont étudié son efficacité chez 10 patients sidéens souffrant de diarrhées causées par des cryptosporidies. Une diminution significative de l'excrétion des oocystes a été observée chez les patients recevant la PRM passant de $3.14.10^8$ à $1.09.10^8$ oocystes/jour contrairement à ceux recevant le placebo. De même, la fréquence des diarrhées a également diminué chez les patients traités par rapport aux témoins avec placebo. A contrario, la seconde étude dirigée par *Hewitt et ses collègues (2000)* entreprise chez 35 personnes atteintes du SIDA ne montre aucune différence significative sur la fréquence d'apparition des diarrhées, la prise de poids et sur l'excrétion des oocystes lors d'un traitement de PRM d'une durée de trois semaines.

Ainsi, malgré une activité anti-*Cryptosporidium* dans les modèles *in vitro* et *in vivo*, l'efficacité relativement restreinte de la paromomycine ne lui permet pas d'être envisagée comme une option

thérapeutique de la cryptosporidiose chez l'Homme. Néanmoins, elle représente la molécule *in vitro* standard utilisée dans les études pré-cliniques de développement de stratégies thérapeutiques contre la cryptosporidiose.

2.1.2 Le Nitazoxanide

Le Nitazoxanide (NTZ) est un composé appartenant à la famille des *thiazolides* initialement découvert par J-F. Rossignol dans les années 1980 dont l'efficacité a été démontrée pour un large spectre d'infections parasitaires, bactériennes et virales (*Cabada et White, 2010*). Son mode d'action inhibe une enzyme importante du métabolisme énergétique anaérobie : la pyruvate ferrédoxine oxydoréductase (PFOR) mais d'autres voies semblent également impliquées dans son activité antiparasitaire (*Fox et Saravolatz, 2005*). A ce jour, il représente la seule option thérapeutique approuvée par la FDA destinée au traitement de la cryptosporidiose chez les enfants âgés d'un an et chez les adultes immunocompétents (*FDA, 2003*).

Utilisation du nitazoxanide en modèles *in vitro* et *in vivo*

Sur un modèle de culture *in vitro* s'appuyant sur les cellules HCT-8, le NTZ s'est avéré très efficace contre le développement de *C. parvum* à des concentrations inférieures à 10 µg/mL (*Cai et al., 2005 ; Gargala et al., 2000 ; 2010*). *In vivo*, plusieurs modèles de cryptosporidioses intestinales et biliaires, tels que des souris néonatales (*Blagburn et al., 1998*), des rats immunodéprimés (*Li et al., 2003*) ou des gerbilles immunodéprimées (*Baishando et al., 2006*) ont montré l'action thérapeutique du NTZ qui augmente la clairance parasitaire.

En revanche, des essais menés sur différents modèles *in vivo* ont conduit à l'obtention de résultats très variables voire divergents en fonction des types d'animaux et des espèces de *Cryptosporidium* utilisées.

Les études menées sur des veaux nouveau-nés, révèlent ainsi des résultats divergents. En effet, des expérimentations menées par *Schnyder et son équipe en 2009*, indiquent une efficacité limitée du NTZ chez des veaux âgés de 1 à 3 jours infectés par 10⁷ oocystes de *C. parvum*. Aucune différence significative sur la réduction des symptômes diarrhéiques et sur l'excrétion des oocystes n'a été remarquée entre les veaux infectés non traités et ceux traités avec deux doses quotidiennes de NTZ à 15 mg/kg de poids vif. De même, l'utilisation prophylactique du NTZ dans le groupe non infecté a suggéré une forme de toxicité caractérisée par un effet délétère sur les muqueuses gastro-intestinales. Au contraire, *l'équipe d'Ollivett (2009)* a mis en évidence de meilleurs résultats concernant l'inhibition de l'excrétion d'oocystes de *C. parvum* avec un protocole similaire mais un inoculum plus faible (10⁶ oocystes)

Une étude réalisée chez des chevreaux nouveau-nés âgés de 2 à 4 jours, traités durant 7 jours à 100 mg/kg/j, n'a pas permis de diminuer la mortalité des animaux ni même le niveau d'excrétion des

oocystes. Le traitement n'a pas non plus été en mesure de corriger la perte de poids induite par la maladie. En revanche, une toxicité aiguë a été enregistrée à ces doses (*Viel et al.,2007*).

Plus récemment, le modèle de diarrhée aiguë du porcelet gnotobiotique qui imite la cryptosporidiose observée chez les enfants, s'est avéré sensible à l'infection par *C. hominis*. Ce modèle a ainsi montré que le NTZ dosé à 100 mg/kg/j pouvait diminuer l'importance des symptômes diarrhéiques et l'excrétion des oocystes mais uniquement en début de traitement. L'augmentation de la durée de traitement et le doublement de la dose de NTZ n'ont pas contribué à améliorer les résultats puisque des problèmes de tolérance ont été signalés (*Lee et al.,2017*).

Utilisation du nitazoxanide chez l'Homme

Une première étude clinique a été menée chez 18 patients maliens souffrant de diarrhées et de déshydratation causées par des infections parasitaires intestinales (*Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Ascaris lumbricoides*, etc.).

Le but de l'étude était de déterminer si la prise quotidienne de deux comprimés de 500 mg de NTZ pouvait être efficace dans le traitement de ces infections durant 7 jours. Parmi les 18 patients, 17 étaient positifs au VIH dont 12 à un stade avancé du SIDA. Les résultats de cette étude ont montré que l'excrétion des oocystes de *C. parvum* a été réduite de plus de 95% chez 7 patients sidéens et une diminution des symptômes diarrhéiques a été observée chez 4 d'entre eux (*Doumbo et al.,1997*). En 1998, *Rossignol et ses collègues* ont été les premiers à étudier en double aveugle l'efficacité du NTZ comparée à l'administration d'un placebo. Les patients inclus dans l'expérimentation étaient des Mexicains sidéens présentant également des infections parasitaires intestinales. Deux doses de NTZ (1g ou 2 g/jour) contre placebo ont été données durant 14 jours consécutifs. Les examens parasitaires ont ensuite été effectués du 15^e au 29^e jours. Les résultats ont montré une absence d'excrétion d'oocystes de *C. parvum* pour 63% des patients ayant reçu la dose de 1 g/jour et 67% pour ceux ayant reçu la dose à 2g/jour. Cette absence d'excrétion a été associée également à une rémission complète des symptômes diarrhéiques chez 86% des patients et aucun effet secondaire n'a été remarqué au cours des 4 semaines d'étude. Toutefois, aucune amélioration significative n'a été observée entre les groupes traités avec le NTZ et ceux ayant reçu le placebo chez les patients dont le nombre de Lymphocytes T CD4+ était inférieur à 50 cellules/mm³. Les données obtenues n'ont ainsi pas permis aux auteurs d'exclure que l'amélioration des symptômes diarrhéiques aient été attribuables à l'élimination d'autres parasites que ceux appartenant au genre *Cryptosporidium*.

Ainsi, *Rossignol et son équipe (2001)* ont entrepris une seconde étude également en double aveugle contrôlée par placebo chez 50 adultes et 50 enfants égyptiens immunocompétents infectés par *C. parvum*. Deux doses de 500 mg/jour ont été administrées pendant 3 jours consécutifs chez les adultes et adolescents ; deux doses de 200 mg/jour chez les enfants âgés de 4 à 11 ans et deux doses de 100 mg/jour chez les enfants âgés de 1 à trois ans. Les résultats de cette étude ont montré que les symptômes

diarrhéiques ont complètement disparu au 7^e jour chez 80% des patients traités au NTZ, contre 41% dans le groupe contrôle avec le placebo. L'absence d'excrétion d'oocystes de *C. parvum* a été constatée chez 67% du groupe NTZ contre 22% pour le groupe placebo. Cependant, 18 patients étaient positifs pour une infection à un autre protozoaire parasite (*Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* ou *Blastocystis hominis*). Une analyse distincte a été réalisée sur le sous-ensemble de patients pour lesquels *C. parvum* était à l'origine des diarrhées et des résultats similaires à ceux précédemment décrits ont ainsi été obtenus. Les auteurs ont également confirmé leurs résultats lors d'une troisième étude chez 90 patients immunocompétents infectés uniquement par *C. parvum* (Rossignol et al.,2006). Toutefois, la très courte durée de traitement (trois jours) ainsi que le suivi des patients jusqu'au 11^e jour, n'a pas permis d'étudier les épisodes de réinfections fréquemment signalés dans la cryptosporidiose.

En 2002, une étude a porté sur une centaine d'enfants zambiens (dont 50 étaient séropositifs au VIH) âgés de 1 à 7 ans souffrant de malnutrition et de cryptosporidiose. Le protocole expérimental comprenait 2 doses de NTZ administrées à 100 mg/jour pendant 3 jours consécutifs. Les enfants séronégatifs au VIH traités au NTZ ont tous présenté une amélioration des symptômes diarrhéiques causés par *C. parvum* avec une absence d'oocystes dans les selles après 7 jours ainsi qu'une réduction de la mortalité. En revanche, dans le groupe contrôle placebo, 18% des enfants sont décédés au cours des 8 jours d'observation (Amadi et al.,2002). Les auteurs ont émis l'hypothèse qu'un traitement plus long de la NTZ avec une posologie plus élevée pourraient être bénéfiques chez les patients atteints du VIH. De ce fait, les auteurs ont réalisé une seconde étude chez 60 enfants zambiens âgés de 1 à 11ans, positifs au VIH et atteints de la cryptosporidiose (Amadi et al.,2009). Malheureusement, aucune différence significative n'a été observée entre les enfants traités avec de fortes doses de NTZ (jusqu'à 400 mg/j) et ceux ayant reçu le placebo pendant 28 jours.

2.1.3 Conclusion

Malgré de bons résultats en modèle *in vitro* et chez certains modèles *in vivo*, le NTZ présente une efficacité variable selon les études et dépend fortement du statut immunitaire du patient. Son utilisation reste donc très limitée dans le traitement de la cryptosporidiose. Par ailleurs, ces études témoignent de la nécessité urgente de développer de nouvelles molécules thérapeutiques efficaces chez les individus vulnérables (individus immunodéprimés et jeunes enfants), souvent issus de pays pauvres et infectés par de multiples pathogènes. Cette recherche de nouveaux médicaments requiert au préalable qu'ils soient détectés dans des banques de molécules pouvant contenir quelques centaines à plusieurs milliers de composés. Cette phase de criblage est couramment effectuée par des approches méthodologiques réalisées en modèle *in vitro* qui assurent une analyse rapide et fiable. Par la suite, les molécules les plus prometteuses sont alors testées sur des modèles *in vivo* avant de passer en phase clinique chez l'Homme.

2.2 Les principaux défis liés au développement de nouvelles molécules contre *Cryptosporidium spp.*

La découverte de nouvelles molécules à visée thérapeutique est un processus laborieux et coûteux dont la finalité demeure incertaine. En effet, de nombreuses molécules ayant de très bons résultats en modèle *in vitro* et *in vivo* sont finalement abandonnées en raison d'échecs apparus tardivement lors des phases cliniques (manque d'efficacité, toxicité, effets secondaires, résistance du parasite). C'est notamment le cas de la *Clofazimine*, identifiée après un criblage moléculaire à haut débit de nouvelles molécules. En effet cette molécule s'est montrée efficace pour traiter des souris infectées par *C. parvum* (Love *et al.*, 2017). Or cette même molécule s'est révélée inefficace lors d'une étude clinique de phase 2a chez des individus immunodéprimés infectés par le VIH et par la cryptosporidiose (Iroh Tam *et al.*, 2021).

Quelles sont les raisons du manque d'efficacité des molécules anti-*Cryptosporidium* ? Plusieurs facteurs limitants ont été identifiés : la résistance du parasite, les limites mêmes des modèles (*in vitro* et *in vivo*), et l'absence de standardisation des essais effectués *in vitro* ou *in vivo*.

2.2.1 La capacité de résistance du parasite

Tout d'abord, la localisation particulière des parasites du genre *Cryptosporidium* au sein de la cellule hôte les rendent difficilement accessibles aux médicaments. En effet, lors de l'infection de la cellule hôte, le sporozoïte ne vient pas se loger de manière intracellulaire mais extra-cytoplasmique. L'espace ainsi formé entre le parasite et la membrane de l'hôte forme la vacuole parasitophore qui assure un rôle de protection au parasite (Figure 4).

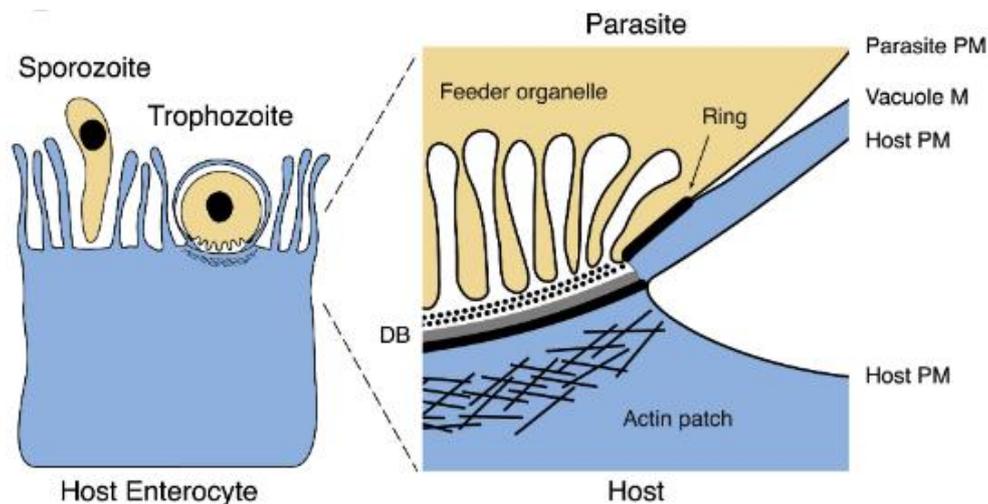


Figure 4 : Représentation de l'interface cellule hôte-parasite. Une structure en forme d'anneau « ring » se forme à l'intersection de la membrane plasmique du parasite (PM) et de la membrane de la vacuole parasitophore (PVM). D'après Guérin et Striepen, 2020.

La vacuole parasitophore contient l'organe nourricier, une structure formée de repliements membranaires constituant la zone d'attachement entre le parasite et l'hôte. Cet organe joue un rôle

majeur dans le développement du parasite puisqu'il est impliqué dans l'absorption des nutriments contenus dans la cellule hôte. Il permet également d'effectuer un contrôle sélectif des molécules importées grâce à des protéines transmembranaires de la famille des transporteurs à cassettes liant l'ATP (*transporteurs ABC*). Ces transporteurs ABC permettent notamment un efflux rapide des médicaments, contribuant au phénomène de résistance. D'autre part, *Cryptosporidium* possède des voies métaboliques réduites le rendant dépendant de son hôte (*Abrahamsen et al.,2004*). Par conséquent, de nombreux médicaments utilisés chez d'autres parasites Apicomplexes (*Plasmodium falciparum* et *Toxoplasma gondii*) ne peuvent pas être employés pour lutter contre le développement de *Cryptosporidium* puisque ce parasite est dépourvu des molécules ou des processus biochimiques ciblés par ces traitements. La découverte de nouveaux médicaments va donc nécessiter de cibler soit des processus biochimiques soit des molécules propres aux Cryptosporidies tout en se garantissant que ces futurs traitements n'interfèrent pas avec le fonctionnement des cellules de l'hôte.

2.2.2 Limitation des modèles *in vitro* et *in vivo* de développement du parasite

Les progrès concernant le développement de nouvelles thérapies pour lutter contre la cryptosporidiose ont été entravés par le manque de modèles adaptés au maintien de la croissance à long terme du parasite aussi bien *in vitro*, qu'en modèles *in vivo*. La majorité des recherches pour permettre la culture ou le développement des cryptosporidies se sont focalisées sur les deux espèces : *Cryptosporidium hominis* et *Cryptosporidium parvum*. En effet, ces deux espèces sont les plus souvent retrouvées dans les épidémies de cryptosporidiose humaine (75% et 20% des cas respectivement) (*Sow et al.,2016*).

Les modèles *in vitro*

Cryptosporidium étant un parasite intracellulaire obligatoire, le choix de la cellule hôte est donc très important. Différentes lignées cancéreuses telles que les Caco-2 (*Human Colonic Adenocarcinoma Cells*), MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney Cells*) et HCT-8 (*Human Ileocecal Adenocarcinoma Cells*) ont été testées et évaluées pour leur aptitude à maintenir l'infection du parasite (*Arrowood et al.,2002*). Finalement, les études ont mis en évidence la robustesse des cellules HCT-8 à supporter l'infection du parasite si bien qu'elles représentent aujourd'hui le modèle de référence pour l'étude du développement de *C. parvum* (*Karanis et Aldeyarbi, 2011*). Cependant, la croissance de *Cryptosporidium* se limite à trois jours et la formation de néo-oocystes n'a jamais été observée, probablement en raison d'un blocage de la fécondation (*Tandel et al.,2019*). Plus récemment, la lignée COLO-680N (*Esophagus Squamous Cell Carcinoma*) a été décrite comme un nouveau modèle *in vitro* de culture à long terme de *C. parvum* (8 semaines) et qui a également permis la production d'oocystes infectieux (jusqu'à J+10) (*Miller et al.,2018*). Toutefois, ces résultats n'ont pas pu être reproduits par d'autres groupes de recherches soulignant l'importance de la reproductibilité des systèmes *in vitro* (*Vélez et al.,2021*). De nouvelles approches s'appuyant sur la culture de cellules souches ont récemment émergé (*Wilke et al.,2019*)

Au-delà du simple choix d'une lignée cellulaire adaptée, de nombreuses études se sont également intéressées aux conditions expérimentales conduisant au développement du parasite. Ces travaux ont permis de créer des milieux d'infestation enrichis (*Upton et al.,1995, King et al.,2008 ; Keegan et al.,2003*), des méthodes d'activation des *inocula* (*King et al.,2012*), pour augmenter le nombre de cellules infectées *in fine*. D'autres études se sont intéressées quant à elles aux paramètres physico-chimiques tels que le taux d'oxygène, le positionnement des cellules à l'interface air liquide ou la mise en place d'un gradient d'oxygénation (*Morada et al.,2016 ; Jalili-Firoozinezhad et al.,2019*).

Ainsi, l'absence de modèle permettant d'appréhender la totalité du cycle de vie du parasite *in vitro* limite la capacité de l'expérimentateur à tester de nouvelles molécules thérapeutiques (surtout celles ciblant les stades de reproduction sexuée à l'origine de la formation des oocystes).

Les limites du modèle cellulaire et des tests *in vitro*

Une étape clé des cultures *in vitro* de *Cryptosporidium* repose sur l'utilisation d'un protocole de désenkystement adapté à l'infection cellulaire. Le désenkystement est également une méthode utilisée pour mesurer la viabilité et l'infectiosité des oocystes. Plusieurs études ont optimisé les différents paramètres chimiques et physiques comme la composition des milieux de culture (*King et al.,2008 ; Keegan et al.,2003*), la température et le pH (*Widmer et al.,2007*) ; l'effet des sels biliaires (*King et al.,2012 ; Gold et al.,2001*) et des protéases (*Forney et al.,1996*) et le temps d'incubation. Ainsi, de nombreux protocoles avec des taux de réussite variables ont été identifiés et la méthode de désenkystement décrite par *Rasmussen et al.,1993* semble la plus efficace (*Pecková et al.,2016*). La variation des taux de désenkystement et de l'infectiosité des oocystes peut dépendre du type cellulaire choisi, de l'âge des oocystes ou de la souche utilisée, à la fois dans les modèles *in vitro* et *in vivo* (*Hijjawi, 2003*). Le nombre de parasites utilisés pour infecter les cellules influence le niveau d'infection. En effet, des études ont montré que des rapports oocyste/cellule =1 ou 0.5 étaient idéaux, à l'inverse, un *inoculum* trop important peut-être désavantageux et réduire la capacité des cellules à supporter l'infection (*Hijjawi, 2003*).

Les modèles animaux

Une autre approche méthodologique pour obtenir le développement des parasites du genre *Cryptosporidium* et tester de nouvelles molécules antiparasitaires consiste à infecter des animaux.

Ces stratégies expérimentales ont permis d'appréhender de nombreuses questions telles que la pathogénèse de la cryptosporidiose, les mécanismes d'interaction entre le parasite et son hôte, la réponse immunitaire de l'hôte (*Chai et al.,1999*), l'impact du microbiote sur l'infection du parasite (*Alak et al.,1999*), les critères de virulence entre les espèces (*Eida et al.,2009*) ou entre les souches (*Sayed et al.,2016*), l'efficacité de méthodes d'inactivation (*Takahashi et al.,2020*), des analyses métabolomiques (*Ng Hublin et al.,2013*) et finalement les effets oncogènes de certaines espèces de *Cryptosporidium*

(Benamrouz *et al.*,2014, Certad *et al.*,2007). Ces modèles animaux ont également permis de tester l'activité antiparasitaire de certaines molécules à visée prophylactique ou thérapeutique.

Ainsi, si on se focalise sur les deux espèces de *Cryptosporidium* présentant la plus forte prévalence chez l'Homme (*C. parvum* et *C. hominis*), de nombreux modèles animaux se sont montrés sensibles à l'infection par *C. parvum* mais peu de modèles ont permis d'appréhender l'étude de *C. hominis*. (Adell *et al.*,2013). En effet, contrairement à *C. hominis*, *C. parvum* présente un très large spectre d'hôtes dans lequel plus de 150 espèces de mammifères ont été identifiées (Xiao *et al.*,2004). Il a ainsi été possible d'infecter des rongeurs (souris, rats, gerbilles, *etc.*), de jeunes ruminants (veaux, chevreaux, agneaux), des porcelets gnotobiotiques (Lee *et al.*,2017) ou encore de jeunes babouins (Jillani *et al.*,2021). Ces modèles ont notamment permis d'obtenir le cycle complet du parasite avec la production d'oocystes infectieux. En revanche, le développement de modèles adaptés à l'infection par *C. hominis* est resté très limité. En 2005, Baishanbo *et ses collègues* ont montré que les gerbilles immunodéprimées représentaient un modèle adapté pour évaluer l'infection par *C. hominis*. Néanmoins, depuis cette découverte, aucun autre laboratoire ne semble utiliser ce modèle. (Widmer *et al.*,2020). Toutefois, le modèle de porcelet gnotobiotique a été infecté avec succès par *C. hominis* et a montré qu'il s'agissait d'un modèle adapté à l'étude de la cryptosporidiose humaine en raison des similitudes anatomiques, physiologiques et par la présence de symptômes analogues à ceux de l'Homme.

Parmi les stratégies en expérimentation animale visant à étudier l'effets de molécules contre *C. parvum*, trois approches ont été développées : l'animal juvénile, l'animal adulte et l'animal immunodéprimé.

Test sur animal Juvénile

Les premiers essais effectués sur des souriceaux nouveau-nés (Ernest *et al.*,1986) ont montré qu'ils étaient très susceptibles à l'infection par *C. parvum* avec une faible dose parasitaire de 310 oocystes (Finch *et al.*,1993). Néanmoins, l'inconvénient de ce modèle réside dans le fait que les durées d'infection sont courtes (<15 jours), ce qui empêche les études de rechute après arrêt du traitement (Fayer *et al.*,1990 ; Blagburn *et al.*,1991). Toutefois, ce modèle a permis d'évaluer l'efficacité anti-*Cryptosporidium* de nombreuses molécules telles que des antibiotiques en combinaison avec des tétracyclines (Fayer *et al.*,1993a), la paromomycine et le nitazoxanide (Blagburn *et al.*,1998), le Lasalocide (Castro-Hermida, *et al.*,2000), la Mangiferine (Perrucci *et al.*,2006), les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Leitch *et He*, 1999), l'Agmatine (Moore *et al.*,2001) et plus récemment, l'efficacité du chitosane sur des souris néonatales CD-1 (Mammeri *et al.*, 2018) ou encore le Tartrolon E (O'Connor *et al.*,2020). Des essais effectués sur de jeunes rats ont quant à eux permis de tester l'influence de probiotiques sur l'infection à *C. parvum* (Guitard *et al.*,2006).

Des expériences ont également été réalisées chez de jeunes ruminants tels que des chevreaux infectés par *C. parvum* pour évaluer l'efficacité de la paromomycine (Mancassola *et al.*,1995), du décoquinat (Mancassola *et al.*,1997), de l'alpha-cyclodextrine (Castro-Hermida *et al.*,2004), du Nitazoxanide (Viel

et al.,2007), du charbon actif (*Paraud et al.*,2011), ou du lactate d'halofuginone (*Petermann et al.*,2014). Les effets anticryptosporidies du lactate d'halofuginone et du nitazoxanide ont aussi été testés sur un modèle de veaux infectés expérimentalement par *C. parvum* (*Naciri et al.*,1993 ; *Ollivett et al.*,2009). Ce modèle expérimental a par la suite été utilisé pour étudier l'effet prophylactique de la paromomycine (*Fayer et al.*,1993b). De même, les essais menés avec des veaux infectés ont permis de tester l'efficacité de l'azithromycine, du co-trimoxazole et du cumin noir (*Nigella sativa*) (*Nasir et al.*,2013) et plus récemment l'efficacité d'un inhibiteur de la *methionyl-tRNA synthetase* (*Hasan et al.*,2021).

Dans la série des animaux juvéniles expérimentalement infectés et utilisés pour tester l'effets de molécules anti-Cryptosporidies, les agneaux ont permis d'appréhender l'effet du Clinoptilolite (*Dinler et al.*,2021). L'équipe de Castro- Hermida a notamment testé l'effet de la beta-Cyclodextrine (2002) et de molécules anti-inflammatoires (2008). L'équipe de Naciri s'est aussi intéressée à ce modèle animal pour tester l'effet préventif du colostrum (*Naciri et al.*,1994).

Enfin, des porcelets gnotobiotiques infectés par *C. hominis* ont permis de tester l'efficacité de molécules dérivées de la Piperazine (*Lee et al.*,2019) ou des inhibiteurs de la protéine kinase dépendante du calcium (*Lee et al.*,2018).

Test sur animaux adultes

Même si des tests d'infection concluants ont été réalisés sur plusieurs espèces d'animaux à l'âge adulte, les modèles murins ont été particulièrement investigués. En effet, *les travaux de Sherwood (1982)* ont mis en évidence que 8 lignées de souris étaient sensibles à l'infection de *C. parvum* aux premiers jours de vie (jusqu'au 4^e jour) alors que ces mêmes lignées âgées de trois semaines étaient résistantes à l'infection du parasite. De même, *Garza et son équipe (2008)* ont également montré que des souris immunocompétentes résistent à l'infection par *C. parvum* et éliminent rapidement le parasite en quelques jours. Un moyen de pallier cette limitation a donc été de travailler avec des modèles immunodéprimés pour obtenir une infection plus rapide et persistante dans le temps.

Test sur animaux immunodéprimés

L'immunosuppression peut alors s'effectuer de façon chimique, en utilisant par exemple la dexaméthasone qui est un puissant immunosuppresseur (*Rasmussen et Healey, 1992 ; Del Coco et al.*,2012) ou en utilisant des lignées de souris dont l'immunosuppression est due à des altérations ou des modifications génétiques, telles que les souris SCID (*Severe Combined Immunodeficient Mice*) ou Nude (*Heine et al.*,1984). Des modifications génétiques peuvent également être réalisées pour supprimer l'expression de certains gènes impliqués dans la réponse immunitaire, on parle alors de souris *knock-out* (KO) comme les souris *knock-out* en interféron gamma (IFN- γ KO) (*You et Mead, 1998*) ou en interleukine-12 (KO IL-12) (*Gorla et al.*,2014). Ces deux modèles (souris IFN $\gamma^{-/-}$ et IL-12p40 $^{-/-}$) ont

d'ailleurs été utilisés par la suite pour mimer une infection chez l'enfant et chez des patients immunodéprimés. Ainsi, les modèles animaux immunodéprimés ont montré une extrême sensibilité au parasite puisque les travaux de *Yang et ses collaborateurs (2000)* ont mis en évidence qu'un seul oocyste était suffisant pour provoquer l'apparition des signes cliniques et l'excrétion du parasite. De plus, cette approche méthodologique a permis d'obtenir une augmentation du niveau d'excrétion des parasites associée à une augmentation des cas de mortalités pour les animaux infectés.

En termes d'outils de criblage et de caractérisation de molécules anti-*Cryptosporidium*, on notera que des souris immunodéprimées ont été utilisées pour tester l'efficacité d'inhibiteur de protéines kinases (*Ojo et al.,2010 ; Castellanos-Gonzales, 2016*), d'inhibiteurs de la 5'-monophosphate déshydrogénase (*Garla et al. 2014*), d'inhibiteurs de la Triacine C (*Guo et al.,2014*), d'inhibiteurs de la lactate déshydrogénase (*Li et al.,2019*), d'inhibiteurs d'histones désacétylases (*Herrera-Martinez et al.,2020 ; Murakoshi, et al.,2020*), de l'oxaborole (*Swale et al.,2019*), d'inhibiteurs de la lysyl-tRNA synthétase (*Bragana et al.,2019*), de la methionyl-tRNA synthétase (*Jumani et al.,2018*). Ces modèles murins immunodéprimés ont également permis de tester de nouveaux composés tels que l'imidazopyrazine KDU691 et la pyrazolopyridine KDU731 (*Manjunatha et al.,2017*) ou des inhibiteurs à base de piperazine (*Jumani et al.,2018*).

Limites du modèle animal et des tests *in vivo*

Cette approche méthodologique doit toutefois faire face à de nombreux freins. En effet, certaines espèces de *Cryptosporidium* présentent un spectre d'hôte très étroit qui ne permet pas d'utiliser les modèles animaux classiquement retrouvés en laboratoire (souris, rat, lapin), contrairement à *C. parvum* dont le spectre d'hôtes est très étendu (*Darabus et Olariu, 2003*). Cette barrière d'espèce liant une espèce d'hôte à une ou deux espèces de *Cryptosporidium* limite donc fortement la diffusion d'un modèle unique d'infection chez l'animal.

L'utilisation même des animaux fait aujourd'hui l'objet de réflexions éthiques et la stratégie des « 3 R » visant à « Réduire Remplacer ou Raffiner » les expérimentations mettant en jeu des animaux, poussent les chercheurs à développer des méthodes alternatives aux tests *in vivo*. Cette réflexion est surtout marquée lorsqu'il s'agit d'effectuer des criblages de grands nombres de molécules, où les modèles animaux ne peuvent pas être envisagés. Le recours à ces modèles se limite donc à la confirmation des résultats obtenus à la suite des criblages réalisés en modèle *in vitro*. De même, la pathogénèse de la maladie ainsi que les voies qui pourraient être ciblées pour le développement de molécules thérapeutiques contre la cryptosporidiose demeurent mal comprises et dans ce contexte, la complexité du modèle animal limite leur utilisation. Ainsi même si de nouvelles approches *in vivo* visant à réduire le nombre d'animaux utilisés par expérimentation (comme en faisant des boucles dans l'intestin des animaux (*Baillou et al.,2021*), les laboratoires encouragent le développement de méthodes *in vitro* pour

les criblages moléculaires de première intention c'est-à-dire pour définir si une molécule présente une activité contre *Cryptosporidium spp.*

2.3 Méthodes de quantification du parasite *Cryptosporidium*

Même si le criblage de nouvelles molécules à visée thérapeutique nécessite une première phase d'infection (qu'elle soit *in vitro* ou *in vivo*), la seconde étape clé du processus nécessite de quantifier le développement du parasite (et le cas échéant, d'évaluer son inhibition par le traitement). Plusieurs approches ont donc été utilisées pour quantifier les niveaux d'infection et notamment, la microscopie et les analyses génétiques. Plus récemment, de nouvelles stratégies ont été développées en employant des parasites transgéniques afin de faciliter les protocoles de criblage.

Pour les approches *in vitro* l'efficacité d'une molécule était initialement déterminée par comptage manuel des parasites ou des foyers infectieux (Rochelle et al.,2001 ; Teichmann et al.,2012). En pratique, les cellules sontensemencées en plaque 96 puits et infectées avec des oocystes de *C. parvum* durant 48 h en présence ou en absence de molécules inhibitrices de la croissance du parasite. Au début, les cellules infectées étaient simplement colorées avec des méthodes standards de type Ziehl Neelsen. Toutefois, par manque de sensibilité et de spécificité, des méthodes d'immunomarquage basées sur l'utilisation d'anticorps fluorescents ont été utilisées pour cibler et visualiser spécifiquement le parasite. Cependant, l'imagerie de fluorescence nécessite plusieurs étapes très chronophages : une étape de fixation, de perméabilisation et d'incubation en présence d'anticorps dirigés contre *C. parvum*. Ensuite, les parasites (ou les foyers infectieux) sont comptés dans plusieurs champs microscopiques. En plus de ces étapes laborieuses, cette technique nécessite du personnel qualifié qui rend son utilisation incompatible avec l'imagerie cellulaire à haut contenu, plus connue sous le nom de *High Content Screening (HCS)*. Cette approche HCS fait ainsi référence à l'utilisation de microscopes automatisés pour générer et traiter une grande quantité d'images dans le but d'évaluer l'efficacité thérapeutique de molécules issues de chimiothèques (méthode sur laquelle s'appuient par exemple des entreprises comme *HCS Pharma* basée à Lille).

2.3.1 Technique d'imagerie

En 2013, Bessoff et ses collègues ont été les premiers à réaliser un test de criblage à haut débit en plaque 384 puits par une approche microscopique s'appuyant sur le modèle cellulaire HCT-8. Cette technique était basée sur l'utilisation d'anticorps fluorescents ciblant une lectine présente à la surface du parasite (Figure 5). L'imagerie et l'analyse des données ont été automatisées afin de faciliter l'identification de composés anti-*Cryptosporidium* parmi 727 composés criblés. Ce procédé a permis d'identifier un inhibiteur de la *HMG-CoA réductase* : l'*itavastine*.

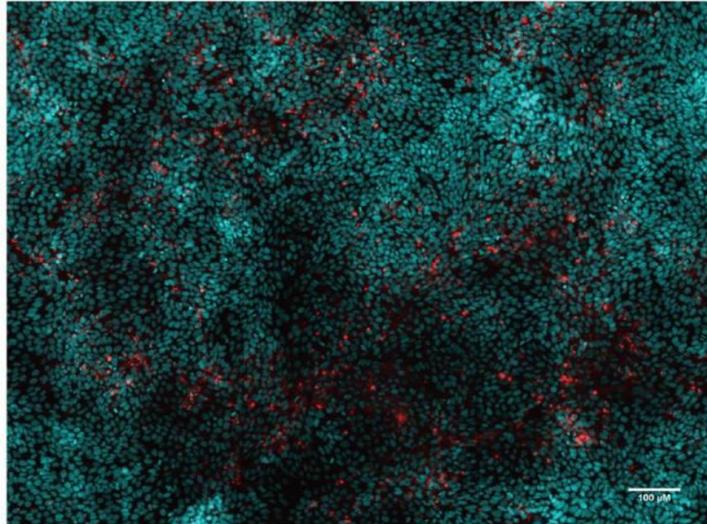


Figure 5 : Image reconstituée (3x3 images à faible grossissement) représentant 13% de la surface du puits. Noyau cellulaire (cyan) et de parasite (rouge). Barre d'échelle 100μm.

2.3.2 Technique CPE, l'effet cytopathique

Une nouvelle méthode basée sur la viabilité des cellules en fonction de l'infection appelée « effet cytopathique » (CPE), a été utilisée par *Chao et son équipe (2018)*. En effet, les tests *in vitro* utilisent couramment les cellules HCT-8 mais celles-ci supportent l'infection du parasite sur de courtes durées (trois jours). Les auteurs ont donc utilisé une nouvelle approche basée sur la viabilité des cellules (*Figure 6*). En effet, ils ont quantifié le pourcentage d'infection par *C. parvum* et par *C. hominis*, en s'intéressant à la viabilité des cellules HCT-8 déterminée par luminescence après utilisation de molécules thérapeutiques. L'avantage de cette méthode est qu'elle simplifie le criblage moléculaire en s'affranchissant des étapes de lavage, fixation, blocage et coloration utilisées en fluorescence mais cette méthode ne permet pas de discriminer l'activité inhibitrice d'une molécule sur la croissance du parasite, de celle d'une action inhibitrice sur les voies de mort cellulaire des cellules hôtes. Ainsi, une confirmation des résultats par imagerie en quantifiant les parasites est donc nécessaire pour valider l'efficacité *in vitro* de la molécule considérée.

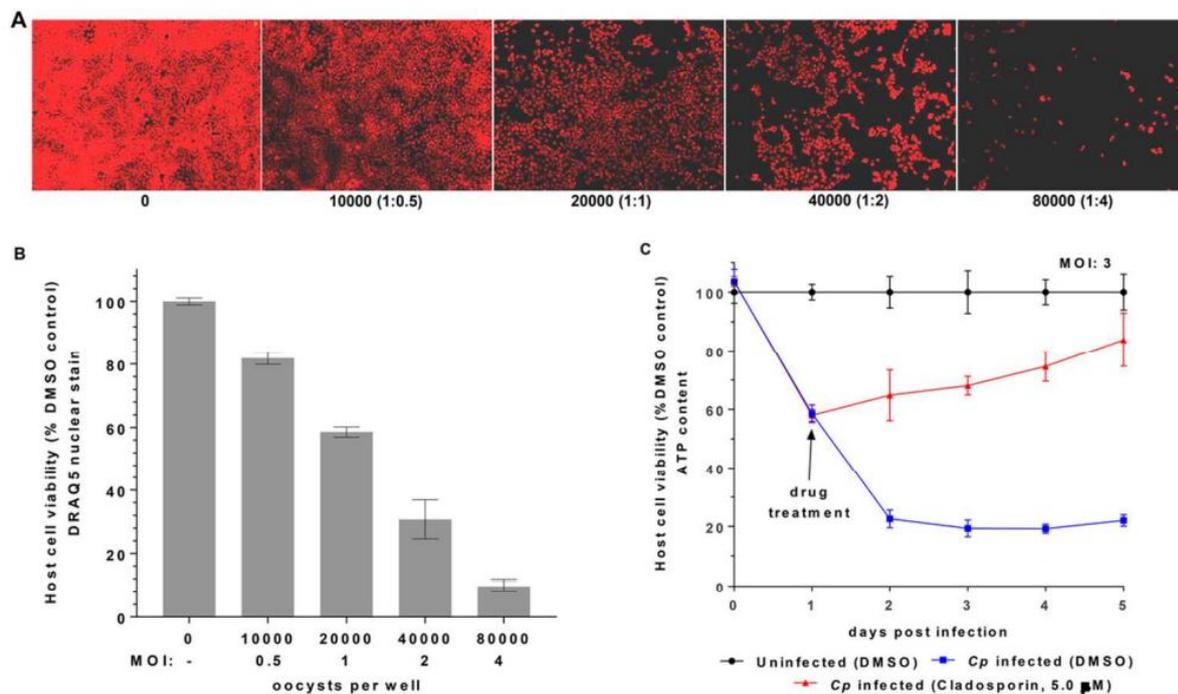


Figure 6 : Effet cytopathique de l'infection par *C. parvum* des cellules HCT-8. (A) Observations microscopiques (B) quantification de la viabilité cellulaire (rouge) en fonction du nombre d'oocystes par cellule (MOI 0, 0.5, 1, 2 et 4) et (C) effet cytopathique induit par *C. parvum* en fonction du temps avec traitement Cladosporine (ligne rouge) ou sans traitement (ligne bleue).

2.3.3 Technique moléculaire

Une autre technique couramment employée dans le criblage de molécules thérapeutiques est la qRT-PCR (*Real Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) qui permet de quantifier la charge parasitaire à partir d'échantillon d'ARN (*acide ribonucléique*). En 2015, *Zhang et Zhu* ont mis au point un protocole de qRT-PCR adapté au criblage à haut débit de molécules. Cette méthode évalue l'efficacité d'un potentiel médicament en détectant les niveaux d'ARNr 18S du parasite. La préparation des échantillons (extraction de l'ARN et purification) est directement réalisée en plaque 96 puits en utilisant des réactifs commerciaux. Le criblage de 1200 molécules combiné à cette méthode a permis l'identification de plusieurs inhibiteurs : *L'Ebselen*, un inhibiteur de la *Glucose-6-phosphate isomerase* de *C. parvum* (*CpGPI*) (*Eltahan et al., 2018*) ainsi que plusieurs inhibiteurs de l'*hexokinase* de *C. parvum* (*CpHK*) (*Eltahan et al., 2019*).

2.3.4 Utilisation de souches transgéniques de *Cryptosporidium*

Pour les approches *in vivo*, la méthodologie la plus classique consistait à rechercher et dénombrer les oocystes excrétés dans la matière fécale des animaux infectés. Cette méthodologie utilisait les mêmes protocoles que ceux précédemment décrits en microscopie à la suite de tests *in vitro*. Toutefois, plus récemment, plusieurs techniques se sont appuyées sur l'utilisation de parasites transgéniques adaptés au

criblage de médicaments *in vitro* et *in vivo*. En 2015, *l'équipe de Striepen* a été la première à modifier génétiquement des souches de *C. parvum* en utilisant la technologie CRISPR/Cas9 afin qu'elles expriment la Nanoluciférase (*Nluc*) (*Vinayak et al., 2015*). Un test bioluminescent *in vitro* a ainsi été décrit par *Hulverson et ses collègues (2017)* et repose sur l'utilisation du réactif *Nano-Glo luciferase* pour quantifier la luminescence émise par le parasite. Le criblage de 400 composés issus de la *Medicines for Malaria Venture Pathogen Box* combiné au test bioluminescent a permis d'identifier 6 nouveaux *Bumped Kinase Inhibitors (BKI)* (inhibiteurs de la CDPK, *Calcium-dependent protein kinase*) avec une inhibition de plus de 95% du développement de *C. parvum* (*Hennessey et al., 2018*).

Les souches transgéniques permettent de faciliter l'étude d'un gène et sa fonction dans le cycle du parasite. En 2019, *Tandel et ses collaborateurs* ont suivi le déroulement du cycle de *C. parvum* pendant 72 h grâce au marquage de l'histone H2B de *C. parvum* avec une protéine fluorescente. Le marquage nucléaire fluorescent a permis d'identifier les différents stades du cycle en fonction de la forme et du nombre de noyaux.

Une surveillance en temps réel de l'infection parasitaire par imagerie en modèle *in vivo* a pu être réalisée par *Manjunatha et ses collègues (2017)* lors de tests d'efficacité du composé KDU731 (*Figure 7*).

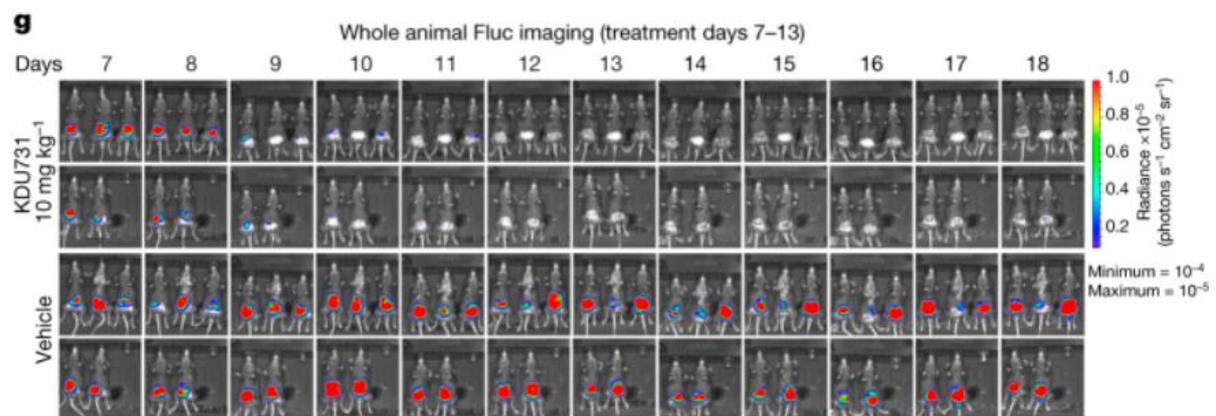


Figure 7 : Cinq souris KO *IFN-γ* ont été infectées avec 10 000 parasites transgéniques exprimant la luciférase de luciole (*FLuc*) et ont été surveillées quotidiennement par imagerie. Sept jours post-infection, les animaux ont été traités avec 10 mg/kg de KDU731 ou avec le vecteur vide (*Figure 2g Manjunatha et al., 2017*).

Des progrès considérables ont été réalisés en utilisant ces souches transgéniques. L'avantage est qu'elles simplifient l'identification de cibles médicamenteuses et les tests bioluminescents facilitent la quantification parasitaire après traitement. Néanmoins, en France les souches transgéniques requièrent un équipement spécialisé dans un laboratoire de classe II-C2, une autorisation de manipulation des OGM (*Organismes Génétiquement Modifiés*) délivrée par le *ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et de l'Innovation (MESRI)* ainsi qu'une animalerie avec des souris infectées continuellement pour obtenir les souches transgéniques.

2.4 Sourcer les nouvelles molécules thérapeutiques : où en sommes-nous ?

L'identification de nouvelles molécules repose en tout premier lieu sur le criblage de chimiothèques *in vitro* afin de repérer d'éventuels changements phénotypiques tout en s'assurant qu'il n'y ait pas de problème de cytotoxicité. Deux stratégies sont alors utilisées : le criblage de molécules inconnues, qui va générer une grande quantité de résultats (issues des images à analyser ou des tests effectués pour chaque point de dilution) et cette génération de données à traiter est d'autant plus grande si la chimiothèque compte des milliers de composés. De même, la molécule considérée va nécessiter d'être purifiée puis solubilisée dans un solvant adéquat, ce qui ralentit considérablement les tests *in vitro*. C'est pour cette raison que les chercheurs réalisent un criblage de molécules à base de chimiothèques ciblées où les molécules qui s'y trouvent ont déjà été caractérisées (aspects pharmacologiques, mode d'action, etc.) ou déjà approuvées dans le traitement de certaines maladies. Dans ce cas, l'approche employée vise à une requalification du médicament pour le traitement de la cryptosporidiose.

2.4.1 Stratégie du criblage de chimiothèques ciblées

Cette stratégie s'appuie sur le criblage de molécules connues ou impliquées dans le ciblage de protéines/enzymes identifiées comme des éléments clés dans le développement du parasite. Cela permet d'accélérer le développement tout en limitant les coûts de recherche.

Les BKI, inhibiteurs de la CDPK1

Les *CDPKs* (*Calcium-Dependent Protein Kinase*) représentent une cible médicamenteuse intéressante pour les maladies liées aux protozoaires parasites du groupe des *Apicomplexa*. Elles sont indispensables aux parasites et n'ont pas de protéines analogues chez les mammifères (*Ojo et al., 2010*). Une banque de molécules constituée d'une centaine d'inhibiteurs de la CDPK appelés *BKIs* (*Bumped Kinases Inhibitors*) a été criblée contre *Cryptosporidium* à la fois en modèle *in vitro* et *in vivo*. *Castellanos-Gonzalez et ses collaborateurs (2016)* ont testé le composé **BKI-1517**. En modèle *in vitro*, les résultats ont montré qu'une concentration de 10 µM a entraîné une réduction de 90% du nombre de parasites dans les cellules HCT-8 infectées avec une *Concentration Efficace médiane* (CE₅₀) comprise entre 10 et 50nM. Chez les souris immunodéprimées *SCID*, les auteurs ont évalué l'efficacité de *BKI-1517* dosé à 60 mg/kg durant 5 jours, administré en une seule ou deux doses quotidiennes à partir du 4^e jour post-infection. De manière surprenante, les 60 mg/kg/j administrés en une seule fois étaient plus efficaces que la dose fractionnée mais une ré-augmentation du niveau d'excrétion des oocystes a été observée chez plusieurs souris au 28^e jour après le début du traitement. Néanmoins, cette rechute a été limitée en doublant la dose de *BKI-1517* et 83,3% des souris ont été guéries.

Un second inhibiteur, **BKI-1369** a montré de bons résultats *in vitro* avec une CE₅₀ de 2,4 µM et une bonne efficacité dans plusieurs modèles animaux infectés par *C. parvum* et *C. hominis*. Douze veaux infectés par *C. parvum* ont aléatoirement reçu le traitement *BKI-1369* à 5 mg/kg/j ou le placebo pendant

5 jours à partir du 2^e jour d'infection. L'excrétion d'oocystes a été réduite jusqu'à 30 fois et une diminution des symptômes diarrhéiques a été observée dès le 3^e jour d'infection. De plus, un gain de poids de 4,5% a été remarqué alors que les animaux du groupe placebo ont légèrement perdu du poids (-0.06%) au 10^e jour post-infection (*Hulverson et al.,2017*). Dans le modèle de porcelet gnotobiotique, 9 porcelets âgés de 2 jours ont été infectés par *C. hominis* (10⁶ oocystes) puis traités avec 10 mg/kg de *BKI-1369* deux fois par jour pendant 5 jours (*Lee et al.,2018*). L'excrétion d'oocystes, la fréquence des diarrhées ainsi que le poids ont été suivis et comparés au groupe contrôle sans traitement. Dans le groupe contrôle, une excrétion importante a été remarquée du 4^e au 11^e jour post-infection avant de progressivement diminuer. En revanche, les porcelets traités au *BKI-1369* ont montré une diminution de l'excrétion d'oocystes tout au long de l'étude dès le 2^e jour de traitement. De même, contrairement au témoin, les symptômes diarrhéiques ont fortement diminué jusqu'à complètement disparaître pour certains porcelets traités. Aucune différence significative n'a été signalée concernant le gain de poids entre les deux groupes. L'analyse histopathologique effectuée au 13^e jour post-infection sur le groupe d'animaux témoins a montré des anomalies structurales des villosités intestinales, une infiltration lymphocytaire de la *lamina propria* ainsi qu'une infection importante de *C. hominis* au pôle apical des cellules épithéliales. En revanche, dans le groupe traité au *BKI-1369*, les dommages cellulaires, l'inflammation et la quantité de parasites ont été fortement réduits.

Cependant, le principal inconvénient du *BKI-1369* est qu'il bloque le canal ionique *hERG* (*Human Ether-a-go-go-Related Gene*) entraînant une cardiotoxicité dès 2 µM et limitant ainsi son utilisation en études cliniques chez l'Homme.

Les inhibiteurs de l'IMPDH (Inosine 5'-Monophosphate Deshydrogenase)

Les voies de biosynthèse des bases puriques et pyrimidiques fournissent les précurseurs indispensables à la synthèse des molécules d'ADN et d'ARN. *C. parvum* ne possède pas de voies de biosynthèse *de novo* et récupère les bases puriques et pyrimidiques directement de la cellule hôte. L'inhibition de ces voies de recyclage semble donc être une cible thérapeutique intéressante. L'*IMPDH* (*Inosine 5'-Monophosphate Deshydrogenase*) catalyse la conversion de l'*Inosine Monophosphate* (*IMP*) en *Xanthine Monophosphate* (*XMP*), première étape limitante impliquée dans la biosynthèse de la guanine. D'origine procaryotique, elle diffère des enzymes issues d'eucaryotes (*Umejiego et al.,2004*), ce qui limite un potentiel effet sur les enzymes de l'hôte.

Gorla et ses collègues (2014) ont évalué l'activité de 8 inhibiteurs sélectifs de l'*IMPDH* de *C. parvum* chez des souris KO IL-12, un modèle mimant une cryptosporidiose humaine aiguë avec des pics d'excrétion d'oocystes au 4^e et 7^e jour post-infection. L'efficacité des inhibiteurs (250 mg/kg) a été déterminée durant 7 jours consécutifs et comparée à celle de la paromomycine (2000 mg/kg). Les résultats montrent que seul le composé *PI31* a diminué de manière significative l'excrétion d'oocystes, de manière similaire à celle du groupe traité par paromomycine. De même, administré à de multiples

doses, *P131* présente une efficacité supérieure à celle de la paromomycine. *P131* s'accumule de manière importante dans les tissus intestinaux, entraînant une forte accumulation dans les cellules épithéliales intestinales. Cette accumulation pourrait jouer un rôle primordial dans son action antiparasitaire.

Ciblage du métabolisme énergétique

La Triacsine C

Bien que les voies métaboliques de *Cryptosporidium* soient extrêmement réduites, celles impliquées dans le métabolisme énergétique et notamment celles de la synthèse des lipides, sont bien présentes. Le génome de *C. parvum* code uniquement pour trois *Acétyl-CoA synthetases* (*ACS*). Par colorimétrie, *Guo et ses collègues* (2014) ont caractérisé l'activité enzymatique des protéines recombinantes *CpACS1* et *CpACS2* et démontré que l'inhibition de ces protéines par la ***Triacsine C*** pouvait diminuer la croissance du parasite, à la fois en culture cellulaire ($CI_{50} = 136$ nM) et chez des souris KO IL-12 où l'excrétion d'oocystes a été réduite de 50 à 88% avec des doses de 8 mg/kg/j à 15 mg/kg/j.

Les inhibiteurs de la GPI (Glucose-6-Phosphate Isomérase)

Le criblage de 1200 composés (*Prestwick chemical library*) a permis d'identifier de nouveaux inhibiteurs de la GPI (*Glucose-6-phosphate isomérase*) de *C. parvum*. Cette étude a découvert que ***l'Ebselen***, un composé organo-sélénium synthétique, pouvait inhiber de façon irréversible la CpGPI avec une CI_{50} de 8.33 μ M sans interférer avec la GPI de l'hôte. Cependant, un intervalle de sécurité relativement faible a été trouvé (4,2 μ M), nécessitant des études supplémentaires quant à la poursuite de son développement contre la cryptosporidiose. (*Eltahan et al., 2018*).

Les inhibiteurs de la LDH (Lactate Déshydrogénase)

La voie glycolytique est apparue comme une cible prometteuse en raison de son rôle primordial dans la production d'ATP (*Adénosine triphosphate*). La LDH permet l'interconversion du pyruvate en lactate et génère de l'ATP. La *lactate déshydrogénase* de *C. parvum* (*CpLDH*) d'origine procaryotique a précédemment été démontrée comme essentielle à la survie, à la virulence et à la croissance du parasite *in vitro* et *in vivo*. Les composés ***NSC158011*** et ***NSC10447*** ont été identifiés pour leur propriété anti-cryptosporidies par l'étude de leurs effets inhibiteurs sur la protéine recombinante *CpLDH* dans les cellules HCT-8. L'analyse des cultures à 48 h post-infection montre que le composé ***NSC158011*** a significativement inhibé la croissance de *C. parvum* avec une CI_{50} de 14,88 μ M lorsqu'il a été ajouté immédiatement et de 15,81 μ M à 2 h post-infestation. Le composé ***NSC10447*** a présenté quant à lui, une CI_{50} de 72.65 μ M. En modèle *in vivo* chez les souris KO IFN- γ , le composé ***NSC158011*** dosé à 400 mg/kg durant 7 jours, a montré une efficacité comparable à celle de la paromomycine (100 mg/kg) sur l'excrétion d'oocystes, alors qu'une dose de 1000 mg/kg a été nécessaire pour le composé ***NSC10447***. L'examen histopathologique réalisé au 9^e jour post-infection a montré que les souris traitées avec les

inhibiteurs de la *CpLDH* avaient conservé une muqueuse intestinale et des villosités intactes, contrairement aux souris infectées non traitées (Li et al.,2019).

Ciblage des acides nucléiques

Le Vorinostat

Le **Vorinostat** est une molécule approuvée par la *FDA* dans le traitement de lymphomes cutanés à cellules T. Son mécanisme d'action repose sur l'inhibition des *histones désacétylases (HDACs)*, une famille d'enzymes qui éliminent les groupements acétyl des histones et qui jouent un rôle dans l'expression des gènes en modifiant le niveau de compaction de l'ADN. Elles interviennent donc dans plusieurs processus biologiques (prolifération cellulaire, migration cellulaire, fonction immunitaire, apoptose et angiogenèse). Dans le cas de *Cryptosporidium*, le *Vorinostat* s'est montré efficace pour inhiber l'*Histone désacétylase 3* de *C. parvum* (*CpHDAC3*). Des études *in vitro* ont montré une inhibition de la croissance parasitaires et une EC_{50} de 0.203 μM a été obtenue. Dans les modèles *in vivo* de souris immunodéprimées infectées par *C. parvum*, une dose de 25 mg/kg/j a permis de diminuer l'excrétion des oocystes après 6 jours de traitement (Guo et al.,2018 ; Herrera-Martínez et al.,2020).

Nullscript

Dans ce contexte, et tout comme le *Vorinostat*, une autre molécule inhibitrice des *HDACs* a récemment été découverte à partir d'une banque de molécules déjà approuvée par la *FDA* : le **Nullscript**. Les auteurs ont démontré que *Nullscript* inhibait la croissance de *C. parvum* en inhibant la désacétylation de l'histone 3 (H3K9). Son efficacité a été démontrée en modèle *in vitro* avec une CI_{50} de 2.1 μM sur les cellules HCT-8 infectées et en modèle *in vivo*, chez les souris *SCID* dont l'excrétion d'oocystes a considérablement diminué après trois jours de traitement à 10 mg/kg/j (Murakoshi et al.,2020).

L'oxaborole AN3661

Swale et ses collègues (2019) ont évalué l'efficacité de **l'oxaborole AN3661** sur des cellules HCT-8 infectées par une souche transgénique de *C. parvum* exprimant la luciférase. En effet, des études antérieures (Sonoiki et al.,2017) réalisées chez *Plasmodium falciparum* et *Toxoplasma gondii* ont montré que *l'oxaborole AN3661* bloquait sélectivement la croissance des parasites en inhibant la *CPSF3* (*Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 3*), une endonucléase impliquée dans le traitement des pré-ARNm dans le noyau. Après 24 h d'infection, une EC_{50} de 0,08 μM a été obtenue, bien plus efficace que le nitazoxanide ($EC_{50} = 2.55 \mu\text{M}$). L'avantage de l'utilisation de souches transgéniques de *C. parvum* est qu'elles ont permis de mettre en évidence le développement anormal des mérontes de type I (stade du parasite impliqué dans la 1^{ère} répllication intracellulaire) dès 20 h post-infection. De plus, en modèle *in vivo* chez des souris $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ et $\text{IL12p40}^{-/-}$ connues pour mimer une infection chez l'enfant et chez des patients immunodéprimés, *l'oxaborole AN3661* a significativement diminué l'excrétion

d'oocystes dès le premier jour de traitement jusqu'au 5^e jour lorsqu'il a été administré à la dose de 20 mg/kg/j.

Ciblage de la synthèse protéique

La synthèse des protéines représente une cible classique dans le développement de médicaments antiparasitaires. C'est notamment le cas de l'*Halofuginone*, un médicament couramment utilisé malgré une marge de sécurité étroite, dans le traitement de veaux nouveau-nés souffrant de diarrhées causées par *C. parvum*. Récemment, les inhibiteurs des **aminoacyl-ARNt synthétases** sont apparus comme une option thérapeutique pertinente pour cibler la synthèse protéique. Les *aminoacyl-ARNt synthétases* utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour catalyser la formation des ARNt chargés de leurs acides aminés correspondant, elles sont essentielles à la fidélité du code génétique.

Inhibiteurs de la lysyl-tRNA synthetase (KRS)

Un criblage phénotypique initialement réalisé chez *Plasmodium falciparum* a permis de mettre en évidence l'utilité du ciblage de la **lysyl-tRNA synthétase, KRS**. Une forte homologie de séquence entre l'enzyme de *P. falciparum* et celle de *C. parvum* (*CpKRS*) laisse supposer que le ciblage de la *CpKRS* pourrait être une stratégie intéressante. Le criblage d'une chimiothèque de 13 000 composés caractérisés pour leurs effets anti-*Plasmodium* a conduit à l'identification du **Composé 5**, un dérivé de la *Cladosporine*. Le *Composé 5* a montré une EC₅₀ de 6 µM contre *C. hominis* (TU502) et une EC₅₀ de 1.3 µM contre *C. parvum* (IOWA) en modèle *in vitro*. Son efficacité a également été validée sur deux modèles de souris immunodéprimées (*NSG : NOD SCID Gamma* et *KO IFN-γ*) infectées par la souche transgénique de *C. parvum* exprimant la *NLuc*. Un traitement de 7 jours à partir du 4^e jour post-infection administré à 20 mg/kg/j a entraîné une réduction significative de l'excrétion des parasites (96%), visualisée en mesurant quotidiennement la luciférase des matières fécales (*Baragaña et al., 2019*).

Inhibiteurs de la phényl-tRNA-synthétase (PheRS)

La réutilisation d'une collection de 59 composés ayant une activité antimicrobienne connue ainsi que des mécanismes d'action déjà identifiés, a conduit à l'identification de plusieurs inhibiteurs de la **Phényl-tRNA synthétase (PheRS)**, les *azétidines bicycliques* comme de nouvelles molécules anticryptosporidiennes et plus particulièrement le composé **BRD7929** (*Vinayak et al., 2020*). Une étude utilisant l'incorporation de l'EdU (un analogue fluorescent de la thymidine) et des anticorps spécifiques de chaque stade de *C. parvum* ont permis de valider le blocage de la réplication du parasite par BRD7929 au stade de trophozoïte (*Funkhouser-Jones et al., 2020*).

Inhibiteurs de la Methionyl-tRNA synthetase (MetRS)

Des inhibiteurs de la **Méthionyl-ARNt synthétase de C. parvum (CpMetRS)**, initialement découverts pour lutter contre les parasites du genre *Trypanosoma* ont été testés sur des cultures HCT-8 infectées par *C. parvum*. Parmi ces inhibiteurs, les **Composés 2093, 2067 et 2069** ont présenté de très bons

résultats en *modèle in vitro*. Leur développement s'est donc poursuivi en modèle murin par *Jumani et ses collègues (2018)* sur des souris immunodéprimées NSG, un modèle d'infection chronique de la cryptosporidiose. Quatre souris ont été infectées avec 10^5 oocystes et traitées au 6^e jour post-infection jusqu'au 10^e jour. La quantification parasitaire réalisée par qPCR au 5^e et 11^e jour post-infection, montre une réduction significative de 98,6% pour le *Composé 2093* ; 83,6% pour le *Composé 2069* mais aucune réduction significative pour le *Composé 2067*. Une seconde étude réalisée chez des souris immunodéprimées IFN- γ KO s'est focalisée sur l'étude du *Composé 2093*. Pour cela, 3 souris ont été infectées avec 10^3 oocystes d'une souche transgénique de *C. parvum* exprimant la luciférase. Les souris ont ensuite été traitées avec 50 mg/kg/J du 6^e au 10^e jour post-infection. Les fèces de chaque groupe ont été collectées quotidiennement afin de quantifier par luminescence la charge parasitaire jusqu'au 20^e jour post-infection. Le *Composé 2093* a présenté la plus forte efficacité antiparasitaire. De plus, contrairement aux souris témoins, les souris traitées ont maintenu leur poids et survécu jusqu'à la fin de l'expérimentation (*Hulverson et al., 2017*).

Toutefois, les essais du composé 2093 sur des veaux ont mis en évidence par la suite un problème de résistance (*Hasan et al., 2021*). En effet, les auteurs ont évalué l'efficacité du *Composé 2093* chez des veaux infectés avec $5 \cdot 10^7$ oocystes de *C. parvum*. Le traitement de 15 mg/kg toutes les 12 h débuté au deuxième jour d'infection, a permis de considérablement diminuer l'excrétion des oocystes. Malheureusement, une augmentation progressive des oocystes excrétés a été observée ainsi qu'une réapparition des symptômes diarrhéiques chez deux des trois veaux traités. Après séquençage, les auteurs se sont aperçus que les deux veaux ayant rechuté étaient infectés par des parasites présentant des mutations dans le gène codant pour la *CpMetRS*. Deux mutations impliquées dans le changement d'un acide aminé (D243E et T246I) ont conféré une résistance au médicament. Des modélisations structurelles ont indiqué que ces mutations perturbaient fortement la liaison de l'inhibiteur à la *CpMetRS*. Par la suite, les tests effectués avec des enzymes recombinantes contenant ces mutations ont montré qu'elles étaient 170 fois moins sensibles à l'inhibition du *Composé 2093*. De même, les parasites *C. parvum* modifiés génétiquement par la méthode CRISPR/Cas9 pour exprimer ces mutations, ont été 128 fois (D243E) et 613 fois (T246I) moins sensibles à l'inhibiteur 2093.

Cette étude renforce le besoin urgent de développer de nouvelles molécules thérapeutiques et l'inquiétude quant à la résistance rapide de *Cryptosporidium* au médicament.

2.4. 2 Stratégie du criblage phénotypique (molécules inconnues)

KDU731

En criblant 6 220 composés ayant une activité connue contre divers parasites protozoaires, les auteurs ont identifié deux inhibiteurs précédemment utilisés contre *Plasmodium* : le composé *imidazopyrazine KDU691* et le composé *pyrazolopyridine KDU731*. Les auteurs ont d'abord établi les CE₅₀ des deux inhibiteurs dans les cellules HCT-8 en utilisant des parasites génétiquement modifiés exprimant la

luciférase. Les résultats présentent des EC₅₀ de 17 mM et 25 mM respectivement, ainsi qu'une sélectivité pour la *Phosphatidylinositol-4-OH kinase* (PI(4)K) de *C. parvum* 50 fois supérieure à celle de leur homologue PI(4)K IIIβ chez l'Homme. L'efficacité de *KDU731* a ensuite été déterminée chez des souris INF-γ KO infectées par 10⁴ oocystes de *C. parvum*. Une dose quotidienne de 10 mg/kg de *KDU731* durant 7 jours, a réduit l'excrétion d'oocystes des souris infectées. De plus, des analyses histologiques réalisées en fin de traitement montrent l'absence de parasites dans les intestins de souris traitées, alors que ce n'est pas le cas chez les animaux non traités. Les auteurs ont ensuite évalué l'efficacité de *KDU731* chez des veaux nouveau-nés. Cinq veaux ont été infectés avec 5.10⁷ oocystes de *C. parvum* puis traités ou non avec 5 mg/kg de *KDU731* toutes les 12 h pendant 7 jours au pic d'infection situé entre le 2^e et 4^e jour post-infection. Chez des veaux traités, les chercheurs ont observé une diminution de l'excrétion des oocystes, des diarrhées et de la déshydratation, dès trois jours de traitement (*Manjunatha et al.,2017*).

MMV665917

Un second inhibiteur à base de pipérazine, le composé *MMV665917*, également utilisé chez *Plasmodium*, s'est montré efficace dans le traitement de la cryptosporidiose. En modèle *in vitro* HCT-8, des CE₅₀ comprises entre 2.10 μM et 4.05 μM ont été déterminées pour différentes espèces (*C. parvum* et de *C. hominis* souche TU502) (*Jumani et al.,2018*). En utilisant des anticorps fluorescents spécifiques de chaque stade du parasite, il a été démontré que le composé *MMV665917* inhibait plus particulièrement le développement des macrogamontes (*Funkhouser-Jones et al.,2020*). Chez les souris NGS, l'efficacité du composé *MMV665917* a été évaluée au 7^e jour post infection à 30 mg/kg/j ou 60 mg/kg/j et comparée à l'efficacité de la paromomycine (administrée à 1000 mg/kg/j) durant 7 jours de traitement. Tout comme pour le traitement à la paromomycine, l'excrétion d'oocystes a été réduite de plus de 90% en présence du composé *MMV665917* mais une rechute a été observée à la dose de 30 mg/kg (mais pas à la dose de 60 mg/kg) (*Jumani et al.,2018*). L'efficacité du *MMV665917* a également été déterminée chez des veaux nouveau-nés infectés avec 5.10⁷ oocystes de *C. parvum*. Une dose quotidienne de 22 mg/kg a été administrée deux jours après le début des diarrhées sévères et s'est poursuivie pendant 7 jours. Le traitement a fortement diminué la sévérité des diarrhées ainsi que la quantité d'oocystes excrétés (94%) (*Stebbins et al.,2018*). Enfin, de bons résultats ont été obtenus chez des porcelets gnotobiotiques (*Lee et al.,2019*). Mais une faible inhibition du canal ionique *hERG*, corrélée à une cardiotoxicité a été signalée. Récemment, un nouvel inhibiteur a été mis au point sans présenter de toxicité concernant le canal *hERG* (*Oboh et al.,2021*)

AN7973

Le composé *AN7973* a été découvert après le criblage d'une chimiothèque comprenant des molécules dérivées du benzoxaborole. Ces composés ont présenté une puissante activité antipaludique qui a poussé les chercheurs à évaluer leur activité anticryptosporidies. Sur un modèle de cellules MDCK, l'*AN7973*

a sélectivement inhibé le développement intracellulaire et plus particulièrement la reproduction asexuée de *C. parvum* (IOWA) et *C. hominis* (TU502) en inhibant la synthèse d'ADN, probablement en ciblant *CPSF3* (*Cleavage and Polyadenylation Specific Factor 3*). En modèle *in vivo*, un traitement de 4 jours au 7^e jour post-infection a permis de réduire l'excrétion d'oocystes à plus de 90% à 10 mg/kg/j et totalement à 25 mg/kg/j chez des souris immunodéprimées (NOD SCID et KO IFN- γ). De plus, son efficacité a également été identifiée chez des veaux nouveau-nés sans effets secondaires, encourageant la poursuite d'études toxicologiques précliniques (Lunde *et al.*, 2019).

Produits naturels

Par criblage phénotypique de 800 produits naturels issus de la *NatProd Collection*, Jin *et ses collaborateurs* (2019) ont identifié 16 entités thérapeutiques présentant une activité inhibitrice de la croissance de *C. parvum* à des concentrations sub-micromolaires (EC₅₀ de 0,122 μ M à 3,94 μ M) en modèle HCT-8. Les trois composés les plus efficaces étaient d'origine végétale (la **Cédrénone**, **Deox B 7,4** et la **Baicaléine**) et aucune cytotoxicité particulière n'a été détectée. Des études supplémentaires seront nécessaires pour étudier le mécanisme d'action et évaluer l'innocuité de ces molécules en modèle *in vivo*.

Une chimiothèque de 3764 molécules dérivées de produits marins a également été criblée dans le but de découvrir de nouveaux inhibiteurs contre *C. parvum*. Après sélection de 23 composés et purification, le macrolide **Léiodolide A** issu d'une éponge du genre *Leiodermatium*, a été testé et a montré une très bonne sélectivité pour le parasite dans les cellules HCT-8 ainsi qu'une EC₅₀ de 103,5 nM (Bone Relat *et al.*, 2022). Il s'agit du second composé d'origine marine identifié pour son activité anti-*Cryptosporidium* après le **Tartrolon E**, un dérivé d'une bactérie symbiotique de mollusques marins dont l'efficacité contre *T. gondii* et *C. parvum* a été démontrée à la fois en modèle *in vitro* et *in vivo* (O'Connor *et al.*, 2020).

2.5 Conclusion

Malgré les nombreux défis liés au développement de *Cryptosporidium*, d'importants progrès ont été réalisés dans l'identification de nouvelles molécules thérapeutiques présentant à la fois une activité *in vitro* et *in vivo* (Tableau 2). Quelques dizaines de composés ont été testés chez plusieurs modèles animaux dont les plus avancés comprennent le BKI-1369, le composé 2093, KDU731 et MMV665917. Le BKI-1369 (inhibiteur de la CDPK1), a montré de bons résultats à faible concentration mais la découverte d'effets secondaires chez le veau et le porcelet gnotobiotique a entravé la poursuite de son développement, obligeant les chercheurs à mettre au point de nouveaux BKI. De même, le composé à base de pipérazine (MMV665917), s'est avéré efficace sur plusieurs modèles animaux mais tout comme le composé BKI-1369, une légère cardiotoxicité a été remarquée, nécessitant des tests d'innocuité supplémentaires. En ce qui concerne le composé 2093, inhibiteur de la PheRS, celui-ci illustre la fragilité des stratégies basées sur des cibles spécifiques. En effet, la récente découverte de la capacité de

résistance spontanée du parasite *C. parvum*, souligne l'importance de découvrir de nouveaux composés en améliorant les techniques de criblages à haut débit et en perfectionnant les tests *in vitro* pour identifier rapidement les phénomènes de résistance.

Molécule	Cible	Efficacité <i>In vitro</i>	Modèle(s) <i>In vivo</i>	Réf
BKI-1517	CDPK	CE ₅₀ (10-50 nM)	Souris SCID	1
BKI-1369		CE ₅₀ 2,4 (+/-0,7) µM	Souris KO IFN-γ Veau Porcelet gnotobiotique Cardiotoxicité	2, 3, 4
P131	IMPDH	CE ₅₀ 7 µM	Souris KO IL-12	5
Triacsine C	ACS	CI ₅₀ 136 nM	Souris KO IL-12	6
Ebselen	GPI	CE ₅₀ 165 µM <u>Faible intervalle de sécurité</u>		7
NSC158011 NSC10447	LDH	CI ₅₀ 14,88 µM CI ₅₀ 15,81 µM	Souris KO IFN-γ	8
Vorinostat	HDAC	CE ₅₀ 0.203 µM	Souris KO IL-12	9, 10
Nullscript		CI ₅₀ 2.1 (+/-0,6) µM	Souris SCID	11
AN3661	CPSF3	CE ₅₀ 0,08 µM	Souris IFNγ ^{-/-} Souris IL12p40 ^{-/-}	12
5	KRS	CE ₅₀ 6 µM (<i>C. hominis</i>) CE ₅₀ 1,3 µM (<i>C. parvum</i>)	Souris NSG Souris KO IFN-γ	13
BRD7929	PheRS	CI ₅₀ 0,06 µM	Souris NSG Veau	14, 15
2093	MetRS		Souris NSG Souris KO IFN-γ Resistance chez le veau	16, 17, 18
KDU731	PI(4)K	CE ₅₀ 25 mM	Souris NSG Souris KO IFN-γ Veau	20
MMV665917	Inconnue	CE ₅₀ (2,1 – 4 µM)	Souris NSG Souris KO IFN-γ Veau Porcelet gnotobiotique Cardiotoxicité	15, 16, 21, 22
AN7973	CPSF3	CE ₅₀ 0,6 µM (<i>C. hominis</i>) CE ₅₀ 0,1-0,4 µM (<i>C. parvum</i>)	Souris NSG Souris KO IFN-γ Veau	23
Léiodolide A	Inconnue	CE ₅₀ 103, 5 nM		24

Tableau 2 : Molécules thérapeutiques contre la cryptosporidiose. Stratégies de criblage de molécules connues, (basée sur la cible) en bleu et de molécules inconnues en vert.

Abréviations : ACS (Acétyl-CoA synthétases) ; CDPK (Calcium-Dependant Protein Kinase) ; CPSF3 (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 3) ; GPI (Glucose-6-phosphate Isomérase) ; HDAC (Histones déacétylases) ; IMPDH (Inosine 5'-Monophosphate Deshydrogenase) ; KRS (Lysil-tRNA synthetase) ; LDH (Lactate déshydrogénase) ; MetRS (Méthionyl-tRNA-synthetase) ; PheRS (Phényl-tRNA synthetase) ; PI(4)K

(phosphatidylinositol-4-OH kinase). Références : [1] Castellanos-Gonzales et al.,2016 [2] Hulverson et al.,2017 [3] Lee et al.,2018 [4] Van Voorhis et al.,2021 [5]Gorla et al.,2014 [6] Guo et al.,2014 [7] Eltahan et al.,2018 [8] Li et al.,2019 [9]Guo et al.,2018 [10] Herrera-Martinez et al.,2020 [11] Murakoshi et al.,2020) [12] Swale et al.,2019 [13] Baragaña et al.,2019 [14]Vinayak et al.,2020 [15] Funkouser-Jones et al.,2020 [16] Jumani et al.,2018 [17] Hulverson et al.,2017 [19] Hasan et al.,2021 [20] Manjunatha et al.,2017[21] Stebbins et al.,2018 [22] Lee et al.,2019 [23] Lunde et al.,2019 [24] Bone Relat et al.,2022

Partie 3 : La spectroscopie d'impédance

Les modèles cellulaires *in vitro* sont indispensables dans le domaine de la découverte de molécules thérapeutiques. En effet, contrairement aux modèles animaux, ces modèles améliorent la productivité tout en étant plus économiques et éthiques. Actuellement, le suivi physiologique des cellules dépend principalement de méthodes invasives qui nécessitent l'utilisation de marqueurs cellulaires spécifiques et qui entraînent l'arrêt des expérimentations à différents temps pour obtenir plusieurs points de mesure. Ces techniques très chronophages et coûteuses génèrent des quantités importantes de données, qui par manque d'automatisation, ne sont pas adaptées au criblage à haut débit.

Parmi les techniques non invasives permettant de suivre l'état physiologique de cellules en temps réel, la mesure de la *Résistance Electrique TransEpithéliale (TEER)* permet de mesurer la résistance électrique à travers une monocouche cellulaire en appliquant un courant continu à travers des électrodes placées de part et d'autre du tapis cellulaire dont les cellules se sont développées sur une membrane semi-perméable (*Figure 8*).

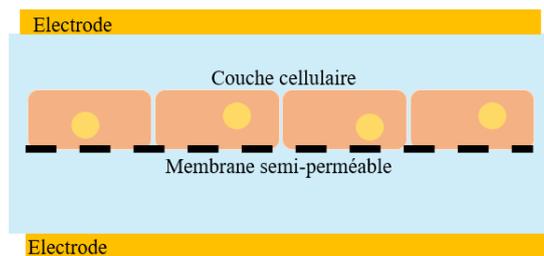


Figure 8 : Représentation de la configuration TEER.

La TEER permet d'obtenir des informations concernant l'intégrité de la monocouche cellulaire qui va former une interface sélectivement perméable appelée « barrière » et plus particulièrement au niveau des jonctions intercellulaires.

Dans notre cas où l'étude porte sur des cellules infectées par *C. parvum*, cette approche n'est pas assez discriminante pour détecter avec précision l'infection des cellules par le parasite. En effet, cette méthode permet de mesurer des effets majeurs sur le tapis cellulaire (altération des jonctions intercellulaires voire mortalité des cellules). Ainsi, il faudrait attendre que l'infestation ait lieu et que le tapis soit fortement perturbé pour observer un effet, ce qui conduirait à la détection d'une réponse à la fois tardive et peu sensible. De même cette variation de réponse électrique serait difficilement corrélée avec les stades de développement parasitaires. En d'autres termes, les mesures de TEER ne permettraient pas d'identifier si une inhibition du parasite induite par une molécule ciblerait les phases de reproduction asexuées ou sexuées.

A l'inverse, la spectroscopie d'impédance appliquée aux cellules, également connue sous le terme d'ECIS, *Electric Cell-substrate Impedance Spectroscopy* (Giaver et Keese, 1984) utilise un courant

alternatif et balaye une gamme de fréquences permettant ainsi d'obtenir davantage d'informations par rapport aux mesures fournies par l'approche TEER. En fonction de la fréquence utilisée, la technique ECIS permet non seulement d'obtenir des informations sur les modifications intercellulaires mais elle permet également d'effectuer des mesures transcellulaires. En effet, aux basses fréquences (< 2 kHz) le courant va se déplacer entre et sous les cellules (*Figure 9A*) alors qu'aux hautes fréquences (> 40 kHz) le courant pourra traverser la membrane et le cytoplasme des cellules (*Figure 9B*). Cette technique permet donc d'acquérir des renseignements sur l'ensemble de la cellule, de façon non invasive, sans marquage spécifique et en temps réel. La première utilisation de cette méthode sur le développement *in vitro* de cryptosporidies par *Dibao-Dina (2015)*, a d'ailleurs permis de mettre en évidence un lien entre les formes de vies adoptées par le parasite lors de son développement et la réponse électrique mesurée par ECIS..

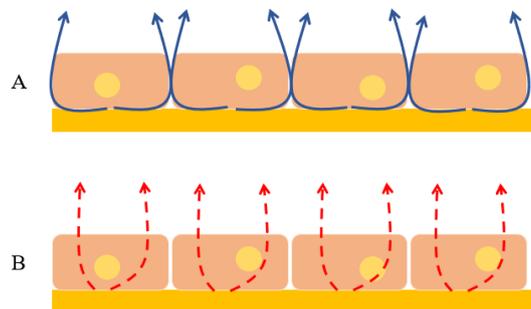


Figure 9 : Passage du courant paracellulaire aux basses fréquences (A) et transcellulaires aux hautes fréquences(B).

3.1 Principe de la spectroscopie d'impédance appliquée aux cellules

Cette méthode consiste à cultiver des cellules dans des puits tapissés d'électrodes et d'appliquer un courant alternatif de faible voltage (~ 10mV) entre ces électrodes. Le milieu de culture cellulaire étant conducteur, va permettre au courant de circuler. Les cellules de forme arrondie vont être déposées au fond du puits au contact de l'électrode. Au fur et à mesure, les cellules vont adhérer, s'aplatir et proliférer pour finalement recouvrir entièrement la surface du puits de culture. Tout au long de la croissance cellulaire et jusqu'au stade de confluence, le courant va être de plus en plus entravé par la présence de ces cellules ce qui aura pour effet de produire une augmentation graduelle d'une quantité mesurable électriquement appelée l'impédance du système. A l'inverse, lorsque les cellules vont commencer à mourir, une baisse de cette entrave sera observée en raison de leur décollement progressif qui permettra au courant de circuler de nouveau via les espaces vides libérés par les cellules mortes. La sensibilité du signal va alors dépendre du nombre de cellules, de leur forme (*Figure 10*), de leur niveau de confluence, de leur métabolisme et de leur état général (niveau de viabilité).

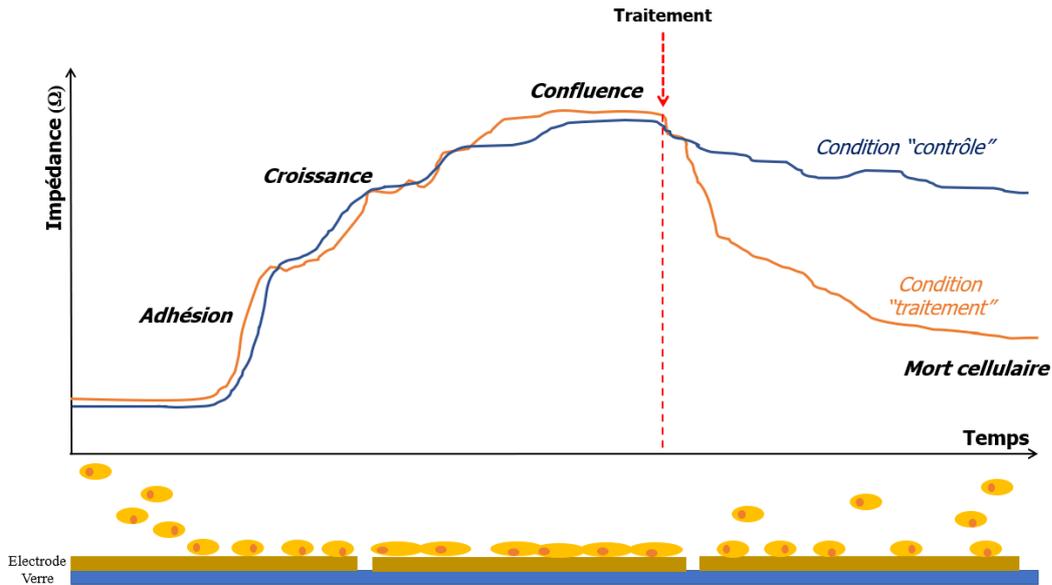


Figure 10 : Principe de la spectroscopie d'impédance appliquée aux cellules.

3.2 Electrodes interdigitées

Ehret et ses collègues (1997) ont été parmi les premiers à utiliser des électrodes interdigitées pour étudier la croissance et l'état physiologique de cellules. Ces électrodes se présentent sous la forme de bandes parallèles (également appelées doigts), alternativement interconnectées. Actuellement, ce type d'électrodes de taille micrométrique, est devenu un modèle standard puisqu'elles sont adaptées à la miniaturisation et offrent une surface de détection importante pour suivre l'évolution cellulaire. Comme cela a été démontré dans la thèse de T. Houssin (2011) qui a effectué une étude comparative de 4 géométries d'électrodes différentes, l'amplitude du signal, la profondeur du champ électrique ainsi que la sensibilité sont principalement dépendantes de la géométrie des électrodes et de leur configuration (le nombre de doigts, la longueur et la largeur des doigts et l'espacement entre les électrodes).

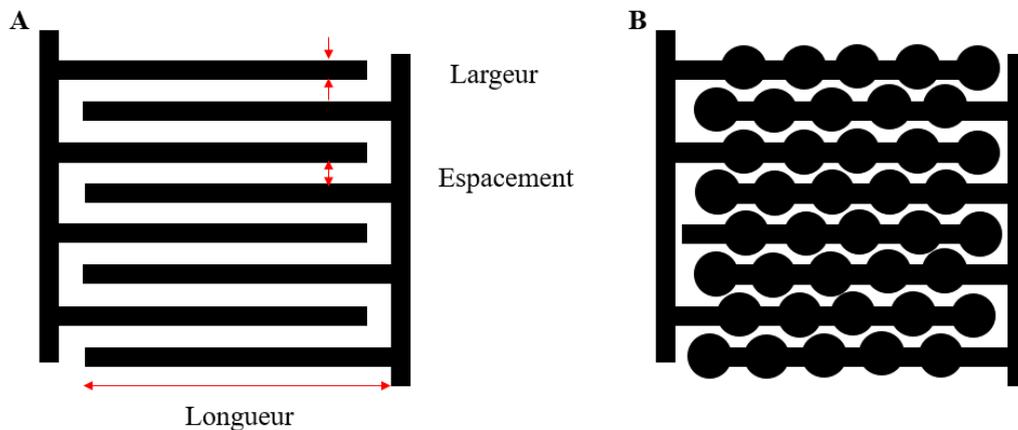


Figure 11 : Représentation schématique d'une électrode interdigitée de forme droite (A) et arrondie (B).

3.3 Domaines d'application

3.3.1 Étude du comportement cellulaire

Les mesures impédimétriques peuvent être utilisées pour étudier de nombreux processus cellulaires grâce au suivi en temps réel et de manière non invasive tels que la croissance ou la différenciation cellulaire. En effet, *Wang et ses collègues (2010)* ont montré que les différentes étapes du cycle cellulaire des cellules HeLa pouvaient être identifiées en fonction des variations observées pendant l'acquisition des mesures impédimétriques. Ainsi, l'impédance augmentait pendant les phases de croissance et de réplication (G1 et S) alors qu'elle diminuait à l'approche et pendant la mitose (G2 et M) (*Figure 12*). La discrimination des phases du cycle cellulaire est une étape importante dans le développement thérapeutique car l'activité de certaines molécules peut dépendre du cycle cellulaire. Réciproquement, certaines molécules pourraient présenter des effets altérant le cycle cellulaire.

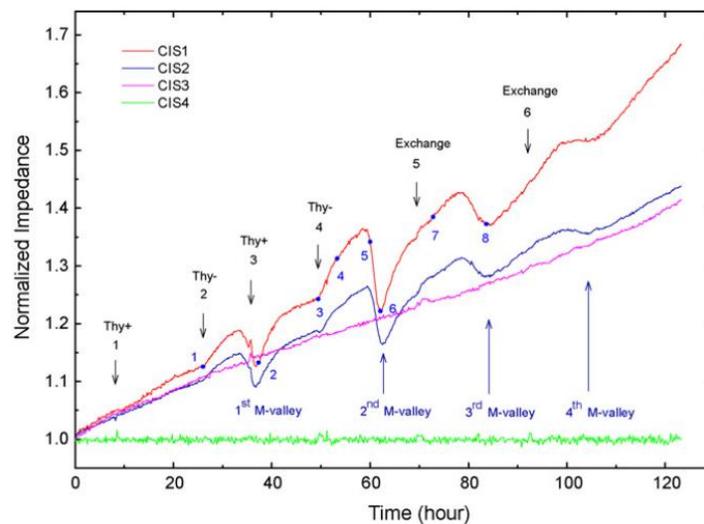


Figure 12 : Impédance normalisée à 60 kHz en fonction du temps mesurée sur des cellules HeLa. Synchronisation des cellules en utilisant la thymidine (CIS1 et CIS2) par rapport aux témoins non synchronisés (CIS3) et sans cellules (CIS4). Les flèches noires indiquent les changements de milieu de culture et les points bleus numérotés font référence aux observations microscopiques (*Wang et al.,2010*).

La différenciation cellulaire est un processus biologique au cours duquel une cellule va se spécialiser en un type cellulaire avec des caractéristiques morphologiques et physiologiques particulières en fonction du tissu. En 2011, *Bagnaninchi et Drummond* ont induit la différenciation de cellules souches issues du tissu adipeux vers les adipocytes et les ostéoblastes. Leurs résultats présentés dans la *figure 13*, montrent des profils impédimétriques distincts entre les cellules différenciées et les cellules non différenciées quatre jours après l'induction de cette différenciation cellulaire.

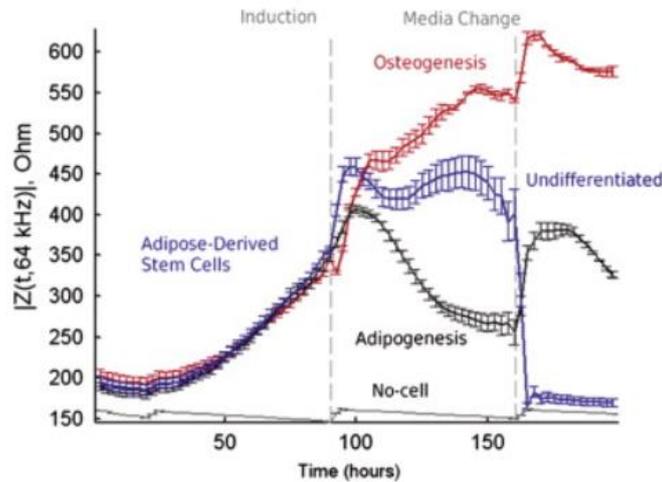


Figure 13 : Différents profils d'impédance des cellules soumises à l'ostéogénèse, à l'adipogénèse et des cellules non différenciées, à 64 kHz en fonction du temps (Bagnaninchi et Drummond, 2011).

De plus, la spectroscopie d'impédance présente également l'avantage de détecter certains comportements cellulaires très précocement, avant même que ces derniers ne soient visibles en microscopie.

Ainsi, l'étude menée par *Shah et ses collègues (2021)* sur des cellules souches neurales, a montré que l'impédimétrie permettait de distinguer les cellules qui proliféraient de celles qui se différençaient. Ce qui est remarquable, c'est que cette distinction a été obtenue plus rapidement qu'avec les méthodes classiques s'appuyant sur l'observation microscopique. En effet, la différenciation neurale a été discriminée de la prolifération dès le 2^e jour post-acquisition, soit un jour après l'induction de la différenciation, alors qu'en microscopie les changements morphologiques ont été observés seulement à partir du 4^e jour.

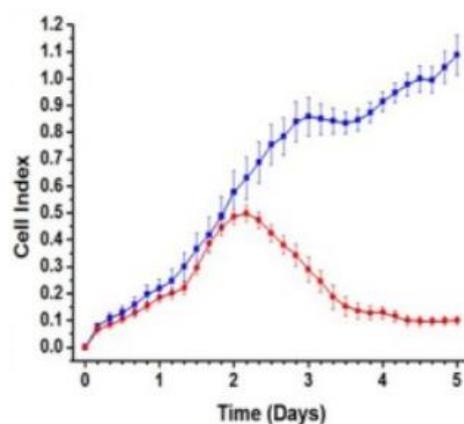


Figure 14 : Impédance normalisée (Cell index) en fonction du temps des cellules LUHMES (Lund Human Mesencephalic) ensemencées à 60 000 cellules/cm². La prolifération cellulaire est représentée en bleu et la différenciation en rouge (Shah et al., 2021).

La sensibilité et la capacité d'analyse des comportements cellulaires offertes par la spectroscopie d'impédance ouvrent le champ d'application de cette méthode à l'étude de maladies impliquant des altérations du comportement cellulaire tels que les cancers (*Han et al., 2007 ; Anchan et al., 2019 ; Fuentes-Vélez et al., 2021*) ou des altérations de barrières épithéliales (telles que certaines neuroinflammations) (*Kho et al., 2017*). De même, cette méthode s'est montrée particulièrement adaptée à l'étude des effets cytopathogènes (effet sur le métabolisme cellulaire induits par des virus) (*McCoy et Wang, 2005 ; Cheng et al., 2015*) et plus récemment à l'étude des perturbations induites par des protozoaires parasites (tels que les parasites du genre *Cryptosporidium*) (*Houssin et al., 2010 ; Diba-Dina et al., 2015 ; McGrath et al., 2017*).

Dans le domaine de la recherche contre le cancer, la prolifération et la différenciation cellulaire sont des processus souvent altérés et conduisent à des comportements cellulaires anormaux. Les cellules cancéreuses vont alors présenter des caractéristiques distinctes des cellules saines qui pourront être quantifiées par impédance. Dans ce contexte, *Han et ses collègues (2007)* ont mis en évidence la possibilité de discriminer les cellules saines et les différents stades de cellules cancéreuses du sein. Leurs résultats démontrent que plus le stade cancéreux est avancé, plus l'impédance va diminuer.

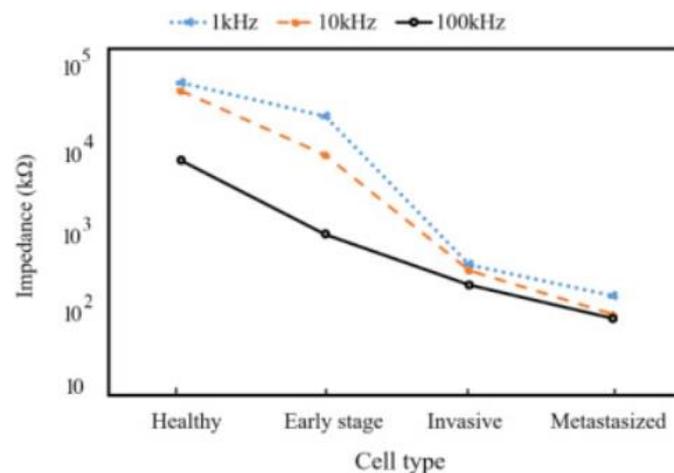


Figure 15 : Evolution de l'impédance mesurée à 1 kHz, 10 kHz et 100 kHz en fonction du type cellulaire (saines et cancéreuses). Données extraites par Hedayatipour et al., 2019 à partir de l'étude de Han et al., 2007.

La multirésistance est la principale cause d'échec de la chimiothérapie qui représente donc un défi considérable dans la recherche contre le cancer. Dans ce contexte, *Fuentes-Vélez et ses collègues (2021)* ont étudié la chimiorésistance de cellules cancéreuses de côlon (HT-29) à la doxorubicine. Des profils caractéristiques ont été observés entre les cellules sensibles (HT-29 WT) et les cellules résistantes (HT-29 DX). Après une exposition de 72 h au médicament, des CI₅₀ différentes ont été trouvées en effectuant un test de cytotoxicité basé sur l'impédance : 8,23 μM pour les HT-29 DX contre 1,09 μM pour les HT-29 WT, alors qu'une chimiothérapie classique ne dépasse pas les 5 μM. Ainsi, les données impédimétriques sont intéressantes pour surveiller en temps réel la chimiorésistance des cellules cancéreuses puisque la chimiorésistance est souvent observée après plusieurs semaines de thérapie.

D'autres études se sont focalisées sur la surveillance en temps réel du potentiel invasif des cellules cancéreuses. *Anchan et associés (2019)* ont surveillé l'intégrité de la barrière endothéliale lors d'ajout de cellules issues de mélanome. Leurs résultats démontrent que les cellules détériorent l'intégrité de la barrière endothéliale très rapidement, dans l'heure qui suit l'ajout des cellules, en commençant par altérer les jonctions paracellulaires puis l'adhérence basolatérale. Ces effets délétères ont été confirmés par microscopie mais de façon retardée, montrant la sensibilité et la précocité de détection par l'impédance et l'importance du suivi en temps réel automatisé.

De nouvelles stratégies sont en cours de développement pour combiner les mesures impédimétriques avec des analyses physiques des cellules. Cette approche vise à affiner la capacité d'analyse pour obtenir un diagnostic des risques liés à la présence de cellules cancéreuses (*Takayama et al., 2018*).

Dans de nombreuses maladies, la fonction barrière des cellules est compromise et la mesure de la perméabilité présente un intérêt majeur. En effet, *Kho et ses collègues (2017)* se sont intéressés à la dégradation de la barrière hémato-encéphalique qui est une caractéristique d'une neuroinflammation. Le but de l'étude était de déterminer si les cellules endothéliales interagissaient préférentiellement avec les monocytes après une activation de l'endothélium par des molécules proinflammatoires (IL-1 β et TNF α). Ils ont évalué l'intégrité de la barrière endothéliale lors de la fixation de monocytes et leur migration à travers cette barrière. En analysant les données impédimétriques, les auteurs se sont aperçu qu'une perte d'intégrité de la barrière endothéliale était plus importante lors d'une activation par l'IL-1 β et que certaines populations de monocytes avaient une plus grande capacité à altérer la monocouche cellulaire.

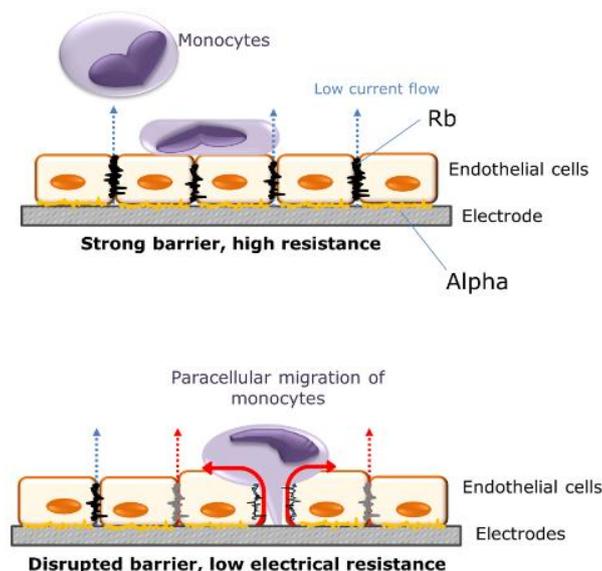


Figure 16 : Altération de la barrière endothéliale provoquée par la migration de monocytes (*Kho et al., 2017*).

Enfin, la spectroscopie d'impédance émerge comme un outil important pour la recherche et l'étude de nouveaux médicaments. En effet, cette méthode prouve son intérêt non seulement lors du criblage de molécules (ou banques de molécules) pour leurs effets contre des agents pathogènes mais également pour identifier l'effet cytotoxique des composés testés.

3.3.2 Test de cytotoxicité

Lors de la recherche de nouveaux composés thérapeutiques, il est primordial d'évaluer les effets cytotoxiques des molécules candidates. Il est donc indispensable de mettre au point des tests permettant de visualiser la mort cellulaire et les dommages causés aux cellules tels qu'une altération de la fonction de barrière. Dans ce contexte, les mesures d'impédance sont bien adaptées puisque la mort cellulaire, les changements d'adhésion des cellules sur les électrodes et la réduction des contacts entre les cellules peuvent être visualisés par la mesure des variations d'impédance. Une comparaison entre des méthodes standards d'évaluation de la viabilité cellulaire et une méthode basée sur l'impédance a été réalisée par *Hordyjewska et ses collaborateurs (2022)* ; Ce travail visait à déterminer si l'impédance pouvait suffire à investiguer les effets anticancéreux et antiprolifératifs de deux composés (la bétuline et l'acide bétulinique) tout en surveillant l'aspect cytotoxique de ces molécules. Les auteurs ont comparé les résultats sur la mesure de viabilité cellulaire obtenus par impédance à ceux obtenus par deux tests colorimétriques standards (*Sel de tétrazolium MTT*, qui permet de mesurer l'activité énergétique des mitochondries et le test quantifiant le relargage de la LDH, *lactate déshydrogénase* marqueur d'une lyse cellulaire). Les données obtenues révèlent que l'impédance peut être utilisée avec succès pour remplacer les méthodes standards couramment employées dans la détermination de la viabilité cellulaire (*Hordyjewska et al., 2022*). Ces résultats ont également été confirmés par *An et ses collègues (2019)* qui ont utilisé l'impédance pour évaluer la cytotoxicité de substances issues de la fumée de cigarette. Tout comme l'étude précédente, les taux de viabilité et les valeurs de CI_{50} ont été obtenus et comparés à un test de cytotoxicité colorimétrique standard. Les auteurs concluent que les données impédométriques sont même plus sensibles que le test colorimétrique pour déterminer l'effet cytotoxique d'une molécule (*Figure 17*).

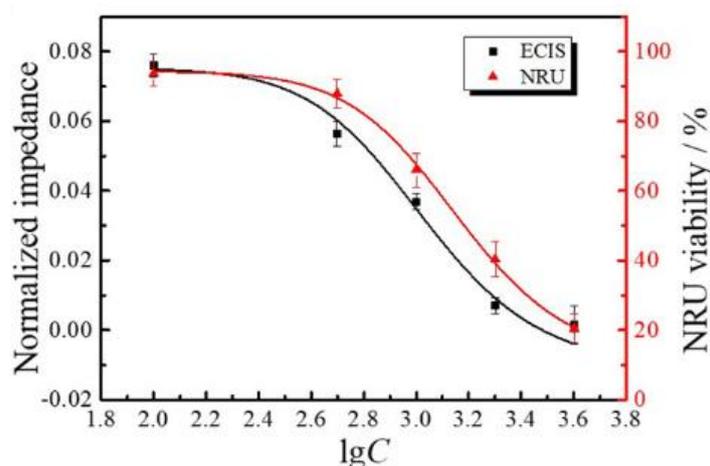


Figure 17 : Détermination de la cytotoxicité de la nicotine par impédance normalisée (NI) et par le test colorimétrique NRU (Neutral Red Uptake) en fonction de concentrations croissantes de Nicotine.

3.3.3 La spectroscopie d'impédance pour étudier des agents pathogènes

La spectroscopie d'impédance a permis de déterminer les effets cytotoxiques de pathogènes tels que les virus. En 2005, *McCoy et Wang* ont été les premiers à utiliser la spectroscopie d'impédance pour surveiller en temps réel le comportement des cellules MDCK pendant l'infection par le virus de la grippe A et l'activité antivirale du chlorure d'ammonium, encourageant ainsi l'utilisation de cette technique pour le criblage de composés antiviraux. Cette technique a notamment permis d'étudier le pouvoir infectieux de souches virales. En effet, les travaux de *Cheng et ses collaborateurs (2015)* ont montré que la spectroscopie pouvait détecter les atteintes du tapis cellulaire (effet cytopathique) en moins de 30 h alors que les techniques standards de microscopie et d'analyses moléculaires nécessitaient 72 h pour obtenir les mêmes résultats. De plus, des variations dose-dépendantes ont été observées en fonction du nombre de virus par cellule infectée (*MOI, Multiplicity Of Infection*) ainsi qu'un profil impédimétrique caractéristique de la souche du virus de la Dengue considérée (*Figure 18*). Ces données montrent donc la grande sensibilité de la spectroscopie d'impédance dans la caractérisation du pouvoir infectieux d'un échantillon viral.

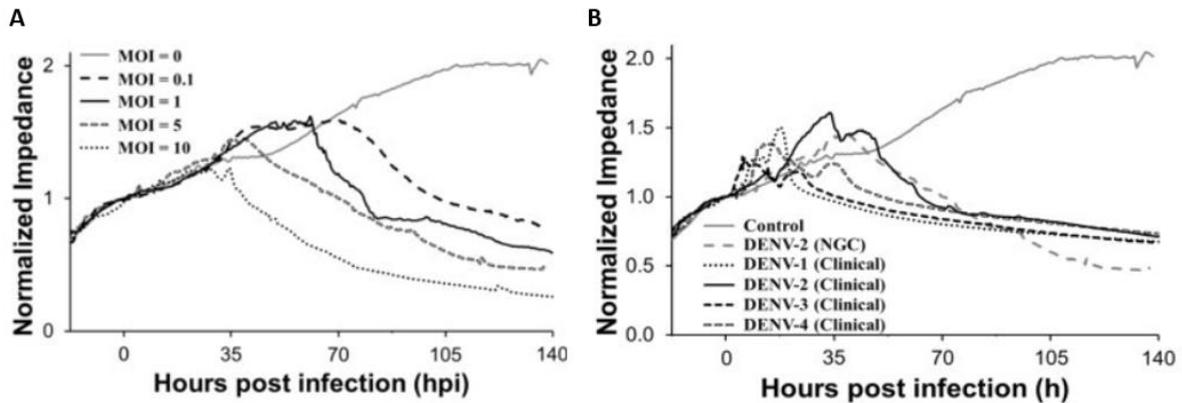


Figure 18 : (A) Impédance normalisée de la réponse des cellules BHK-1 infectées avec DENV-2 NGC à différents MOI (0, 0.1, 1, 5 et 10) (B) Impédance normalisée de la réponse impédimétrique en fonction de 4 souches du virus de la Dengue. (Cheng et al.,2015).

3.4 Utilisation de la spectroscopie d'impédance dans l'étude de *Cryptosporidium*

En s'appuyant sur les propriétés électriques intrinsèques de *Cryptosporidium*, une étude a montré que l'impédance pouvait à la fois servir à compter, identifier différentes espèces de parasites mais également à communiquer des informations sur leur état de viabilité. Ainsi, en 2010, les travaux de T. Houssin et al., ont montré une corrélation très forte entre la réponse impédimétrique mesurée et le nombre d'oocystes de *C. parvum* présents en suspension dans un échantillon. Les auteurs ont également montré des variations de réponses impédimétriques en fonction de l'état de viabilité des lots de parasites testés.

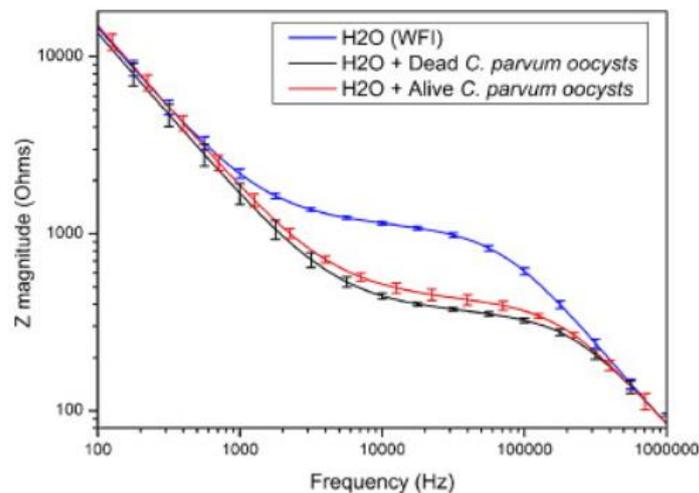


Figure 19 : Spectre d'amplitude d'impédance des oocystes de *C. parvum* morts et vivants en suspension dans une solution d'eau PPI (Pré pour Injection) à une concentration de 1000 oocystes/ μ L (Houssin et al.,2010)

Les travaux de McGrath et son équipe (2017) ont ensuite analysé des échantillons contenant des oocystes de *C. parvum*, des oocystes de *C. muris* et des kystes de *Giardia lamblia*. Les auteurs sont parvenus à caractériser chaque espèce de parasite de manière très efficace (98% *C. parvum*, 93% *C.*

muris et 99% *G. lamblia*) et à discriminer à 90% une population d’oocystes viables vis-à-vis d’une population d’oocystes non viables (inactivés par la chaleur).

En plus de fournir des informations sur la présence de certaines espèces parasitaires et le niveau de viabilité des oocystes pour *C. parvum*, l’approche par spectroscopie d’impédance a également mis en évidence une signature électrique caractéristique lorsqu’un tapis cellulaire est infecté par des parasites de l’espèce *C. parvum*. Ces travaux (Dibao-Dina et al.,2015) sont les premiers à avoir réalisé un suivi électrique en temps réel du développement du parasite. Ils ont notamment montré que les modifications du signal impédimétrique enregistrées lors de l’infestation pouvaient être associées à l’alternance des formes de vies prises par le parasite (invasives / prolifératives). Cette observation suggère ainsi que ce type de mesure électrique pourrait être utilisé pour élaborer des capteurs d’infectiosité (et donc à détecter l’activité de molécules permettant de diminuer cette infectiosité).

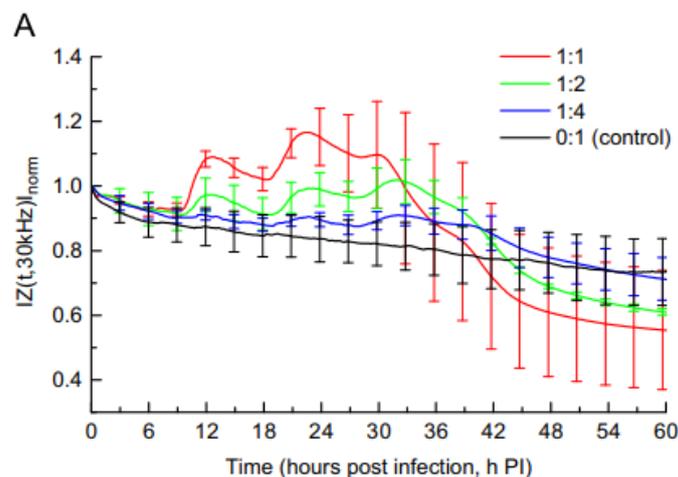


Figure 20 : Réponses impédimétriques des cellules HCT-8 infectées par *C. parvum*. Impédance normalisée à 30kHz pour différents rapports [sporozoïte]:[cellule]. Le témoin négatif 0:1 correspond à des sporozoïtes inactivés par choc thermique (Dibao-Dina et al.,2015).

En considérant que le pouvoir infectieux de *Cryptosporidium* dépend non seulement de l’espèce considérée mais également des différentes souches identifiées chez cette espèce, un outil développé sur la base de la spectroscopie d’impédance pourrait également servir à caractériser des souches parasitaires.

Objectifs de l'étude

Le projet de cette thèse vise à développer un microsysteme basé sur la spectroscopie d'impédance dédié à l'étude du parasite *Cryptosporidium parvum* et au criblage de molécules thérapeutiques.

Dans ce contexte, le premier objectif de ce travail sera de déterminer l'efficacité d'une molécule de référence généralement employée dans le criblage *in vitro* de molécules présentant une activité anti-*Cryptosporidium* : la paromomycine. L'efficacité de la paromomycine sera d'abord déterminée par la méthode de microscopie à fluorescence et se consacrera à la mise au point d'un système automatisé de détection et de quantification des parasites *C. parvum* des images fluorescentes.

Le second objectif sera de confirmer par analyse moléculaire (qPCR) les résultats précédemment obtenus par l'approche microscopique, notamment en comparant les valeurs de *Concentrations Inhibitrices médianes* de la paromomycine (CI_{50}) obtenues par ces deux méthodes.

Enfin, le dernier objectif de la thèse consistera à déterminer l'efficacité de la paromomycine en utilisant une nouvelle approche basée sur la spectroscopie d'impédance afin de comparer et confirmer les résultats impédimétriques avec les deux techniques standards. Pour réaliser ce travail, des électrodes commerciales interdigitées seront utilisées et testées dans le but de concevoir un microdispositif permettant d'analyser plus rapidement les activités anti-*Cryptosporidium* de potentielles molécules à visée thérapeutique. Ce nouveau microdispositif pourra alors être transféré aux laboratoires et sociétés pharmaceutiques impliquées dans la recherche de médicaments contre le parasite.

Matériel et Méthodes

1. Culture cellulaire

1.1 Les cellules HCT-8

Les cellules HCT-8 (*issues d'un adénocarcinome iléocaecal humain*) sont conservées dans une solution à base de 45% de milieu de culture RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) 45% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (=chauffé au bain-marie 30min à 65°C) (*Dutscher P30-5500*), additionné de 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO) dans de l'azote liquide.

Le milieu de culture RPMI-1640 contient 2 mM de L-glutamine stabilisée (*Dutscher P04-18500*) et il est supplémenté avec 1 mM de pyruvate de sodium (*Fisher 11721015*), 10% (vol/vol) de SVF décomplémenté, de 1000 U/mL de pénicilline/streptomycine et de gentamycine. Le milieu est filtré (0,22 µm) pour empêcher tout risque de contamination.

1.2 Les cellules COLO-680N

Les cellules COLO-680N (*issues d'un carcinome œsophagien humain*) sont conservées dans une solution à base de 90% de milieu de culture RPMI-640 et 10% de DMSO dans de l'azote liquide.

Pour cette lignée, le milieu de maintenance RPMI-1640 contient 2mM de L-glutamine stabilisée, 10% de SVF décomplémenté et 5% de pénicilline/streptomycine (1000 U/mL). Le milieu est filtré (0,22 µm) pour empêcher tout risque de contamination.

1.3 Décongélation des cellules

La décongélation des cellules s'effectue rapidement (<1min) en plaçant le cryotube au bain-marie à 37°C. Le cryotube est ensuite désinfecté à l'éthanol 70% avant son ouverture sous le poste de sécurité microbiologique le contenu du cryotube est transféré dans du milieu de culture cellulaire RPMI-1640 préchauffé pour être centrifugé 3 min à 150 g. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot cellulaire est repris dans du milieu de culture puis placé dans une flasque de culture 75 cm² (T75). Ensuite, les cellules sont mises en culture dans un incubateur à 37°C dont l'atmosphère à 5% de dioxyde de carbone (CO₂) est saturée en eau et ce, jusqu'à ce que le tapis cellulaire atteigne 80-90% de confluence.

1.4 Entretien des cellules – Repiquage

Les cellules HCT-8 cultivées en flasque T75 sont repiquées au 1/5, 1/10 ou 1/20 lorsqu'elles atteignent 80-90% de confluence. Les cellules COLO-680N sont repiquées au 1/10 maximum. Le protocole de repiquage s'effectue en retirant le surnageant et en rinçant les cellules avec de la trypsine-EDTA 0,25% (*Dutscher SH30042.02*) puis en incubant les cellules avec 3 mL de trypsine-EDTA 0,25% pendant 5 min à 37°C. Après avoir vérifié que les cellules se soient bien détachées du fond de la boîte, la trypsine

est neutralisée en ajoutant 7 mL de milieu de culture. Une étape de centrifugation (150 g – 3 min- 37°C) permet de retirer le surnageant dans lequel se trouve la trypsine et de resuspendre le culot de cellules dans un volume de 10 mL de milieu de culture adapté au repiquage des cellules.

1.5 Culture des cellules en puits

L'ensemencement des cellules s'effectue par comptage en *Cellule de Malassez* afin de déposer 50 000 cellules dans le puits de *polyméthylsiloxane* (PDMS) de 6 mm réalisé avec un emporte-pièce pour le dispositif ou dans des lames Lab-Tek™ 16 puits (*Thermo Scientific™*). Avant le dépôt des cellules, le prototype est désinfecté à l'éthanol 70% pendant 15 min à température ambiante sous la hotte à flux laminaire et laissé sécher jusqu'à complète évaporation de l'éthanol avant d'être rincé trois fois à l'eau désionisée. Pour faciliter l'adhésion des cellules sur les électrodes ou sur les lames de verre, un *coating* de 40 µg/mL de fibronectine (*SIGMA*) est effectué en laissant la solution 1 h à 37°C. Le surplus est ensuite retiré et le puits est rincé une fois avec du milieu de culture pré-incubé à 37°C. Une croissance de 24 heures permet d'obtenir un tapis confluent pour passer à l'étape d'infection cellulaire par *C. parvum* (*Iowa*).

2. Infection des cultures cellulaires par *C. parvum*

2.1 Test de viabilité des oocystes de *C. parvum*

Les oocystes de *C. parvum* de la souche « IOWA » ont été achetés chez Waterborne™, (New Orleans, LA, USA) et stockés à 4°C dans du tampon PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) contenant de la pénicilline, de la gentamycine, de l'amphotéricine B et 0,001% de Tween 20 jusqu'à leur utilisation. La viabilité des oocystes est déterminée en fonction du taux de désenkystement. Pour cela les oocystes sont incubés 1 h à 37°C dans une solution de PBS contenant 0,25% de trypsine (p/v) et 0,75% (p/v) d'acide taurocholique. Ensuite, les oocystes intacts et ceux « vides » sont comptés au microscope par *Contraste Interférentiel Différentiel (DIC)* (Nikon 80i) au grossissement x630. Le pourcentage de désenkystement a été déterminé à partir du calcul suivant :

$$\text{taux de désenkystement} = \frac{\text{Nombre d'oocystes vides}}{\text{Nombre d'oocystes intacts et vides}} \times 100$$

2.2 Protocoles d'infection des cultures cellulaires par *C. parvum*

Protocole I

Le protocole d'infection utilisé est celui développé par *Keegan et al. 2003* avec une étape supplémentaire de prétraitement des oocystes à la javel 0,05% pendant 10 min à 4°C. Un ratio de 1 oocyste par cellule est utilisé pour infecter le tapis cellulaire. Après une étape de lavage par centrifugation (2100 g, 10 min, TA) des oocystes, le culot d'oocystes est rincé une fois avec du PBS 1X et centrifugé de nouveau selon les mêmes paramètres. Les oocystes sont ensuite incubés dans de l'eau acidifiée (pH = 2,4) contenant

de la trypsine 0,025% (m/vol) à 37°C pendant 20 min afin de permettre le désenkystement en mimant l'environnement retrouvé dans l'estomac. Après une troisième étape de centrifugation, les oocystes sont suspendus dans un milieu de maintenance. Ce milieu de maintenance à base de RPMI-1640 est complétement par 5 mM de glucose, de bile bovine, 0.5 µM d'acide folique, 7 µM d'acide 4-amino-benzoïque, 0.1 µM de pantothénate de calcium, 50 nM d'acide ascorbique, 1% (vol/vol) de SVF décomplémenté, 210 µM de Gentamycine et 170 µM de Streptomycine/Pénicilline.

Protocole II

Les oocystes sont incubés 1 heure à 37°C dans un milieu de désenkystement composé de 0,05% trypsine-EDTA (100 µL) et 0,5% d'hypochlorite de sodium (400 µL). Les oocystes sont ensuite centrifugés (2000 g, 8 min, 4°C) puis lavés trois fois au PBS 1X. Pour terminer, les oocystes sont repris dans du milieu RPMI-1640 avant d'être déposés sur les cellules.

Protocole III

Les oocystes sont centrifugés 3 min à 10 000 g et suspendus dans une solution 5% acide taurocholique pendant 10 min sur glace. Les oocystes sont ensuite lavés quatre fois avec du PBS 1% BSA (*Bovine Serum Albumine*) à 10 000 g pendant trois minutes. Le culot d'oocystes est repris dans un milieu de désenkystement composé de 0,75% d'acide taurocholique et de 0,25% de trypsine dilués dans du PBS 1X et laissé incubé 60-75 min à 37°C. Un premier lavage est réalisé avec du PBS 1X puis un second lavage est effectué avec une solution 50% RPMI-1640/50% PBS. Enfin, les oocystes sont suspendus dans du milieu RPMI-1640 avant d'être ajoutés aux cellules.

Inactivation des oocystes de *C. parvum*

Pour élaborer le témoin négatif dans les tests d'infection, un lot d'oocystes est inactivé en le chauffant à 70°C au bain marie pendant 30 minutes. Une alternative à ce protocole qui a également été utilisé est l'inactivation par une succession de trois chocs thermiques (Azote liquide / 37°C) d'une durée de 1 min 30/ étape.

Préparation des solutions de paromomycine

Six concentrations de paromomycine (Sigma) sont utilisées pour réaliser une gamme de 62,5 – 125 – 250 – 500 – 1000 et 2000 µg/mL par des dilutions en série à partir d'une solution mère de 4 mg/mL diluée dans du milieu de maintenance RPMI-1640 utilisé lors de l'infection. Les solutions 1X et 2X sont réalisées le jour même selon le protocole utilisé et sont ajoutées au temps 4 heures post-infection. Les solutions 2X (125 – 250 – 500 – 1000 – 2000 et 4000 µg/mL) sont ajoutées directement au milieu de maintenance alors que les solutions 1X sont ajoutées après une étape de lavage du tapis cellulaire.

3. Quantification parasitaire par Microscopie

3.1 Détermination de la Viabilité cellulaire

La viabilité des cellules est déterminée en utilisant le co-marquage Syto9 /iodure de propidium (PI) (*ThermoFisher*). Le Syto9 est un colorant d'acides nucléiques traversant les membranes des cellules vivantes qui va émettre une fluorescence verte (Abs/Em = 485/498nm) alors que PI ne traverse les membranes cellulaires que si ces dernières sont mortes ou endommagées, émettant une fluorescence rouge (Abs/Em = 535/617 nm). Une solution à base de 5 µM de Syto9 et 500 µM de PI a été préparée dans du tampon HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*) puis ajoutée aux cellules pendant 30 min à 37°C. Les cellules ont été rincées trois fois au tampon HBSS avant d'être observées en microscopie à fluorescence.

La viabilité cellulaire est déterminée selon le calcul suivant :

$$\% \text{ viabilité} = \frac{\text{Nombre de cellules colorées en rouge}}{\text{Nombre de cellules totales}} \times 100$$

3.2 Marquages immunofluorescents avec des anticorps commerciaux

Les cellules ont été cultivées en 16 chambres de culture Lab-Tek™. Après 72 h post-infection, le surnageant est retiré puis les cellules sont rincées avec du PBS avant d'être fixées avec du méthanol froid 8 min à 4°C. L'immunomarquage est ensuite réalisé en ajoutant des anticorps spécifiques de la reconnaissance des oocystes (Cy3-Crypt-a-Glo™, Waterborne) qui apparaîtront en rouge et des anticorps spécifiques des formes intracellulaires du parasite (FL-Sporo-Glo™ Kit, Waterborne) marquées en vert. Les anticorps sont dilués au 1/20^e et incubés une heure à 37°C.

L'acide désoxyribonucléique (ADN) des cellules est quant à lui marqué en bleu par l'utilisation du Hoechst 33342 (*ThermoFisher R37165*) pendant 5 min.

Pour finir, du milieu de montage (No Fade™ Mounting Medium, Waterborne™) est déposé sur les lames d'observation qui sont ensuite recouvertes par des lamelles couvre-objet et observées au microscope *Leica DMI8*.

3.3 Reconnaissance des formes du cycle de *C. parvum*

Pour déterminer les différentes phases de *C. parvum*, les infections sont arrêtées aux temps 24 heures / 48 heures ou 72 heures et les stades de reproduction asexuée et sexuée sont identifiés par microscopie à fluorescence au grossissement x630 ou x1000 (*Leica DMI8*) grâce aux anticorps commerciaux *A600-FLR-Sporo-Glo* pour les parasites intracellulaires et *Cy3-Crypt-a-Glo* pour les oocystes (*Waterborne™*). L'identification des trophozoïtes, mérontes et gamontes s'effectue en fonction du temps d'infection, du nombre de noyaux et de la taille du parasite (diamètre et aire). Comme le montre la *Figure 21*, les

trophozoïtes présentent une forme caractéristique en « anneau » entourant un unique noyau central. Ils apparaissent dès 8 heures d'infection et possèdent une taille moyenne de 2,38 μm ainsi qu'une aire moyenne de 4,62 μm^2 . Les mérontes quant à eux, apparaissent entre les temps 12 heures et 28 heures post-infection. Ils possèdent plusieurs noyaux (de deux noyaux jusqu'à huit en fin de maturation) et une taille moyenne de 3,61 μm (10,8 μm^2). Enfin, les phases sexuées (gamontes), apparaissent à partir de 36 heures post-infection. Ils possèdent une taille supérieure à celle des mérontes (taille moyenne de 4,9 μm pour une aire moyenne de 19,6 μm^2) et on peut observer à un stade avancé de maturation, un co-marquage avec l'anticorps rouge Cy3-*Crypt-a-Glo* qui peut être visualisé uniquement sur les gamontes.

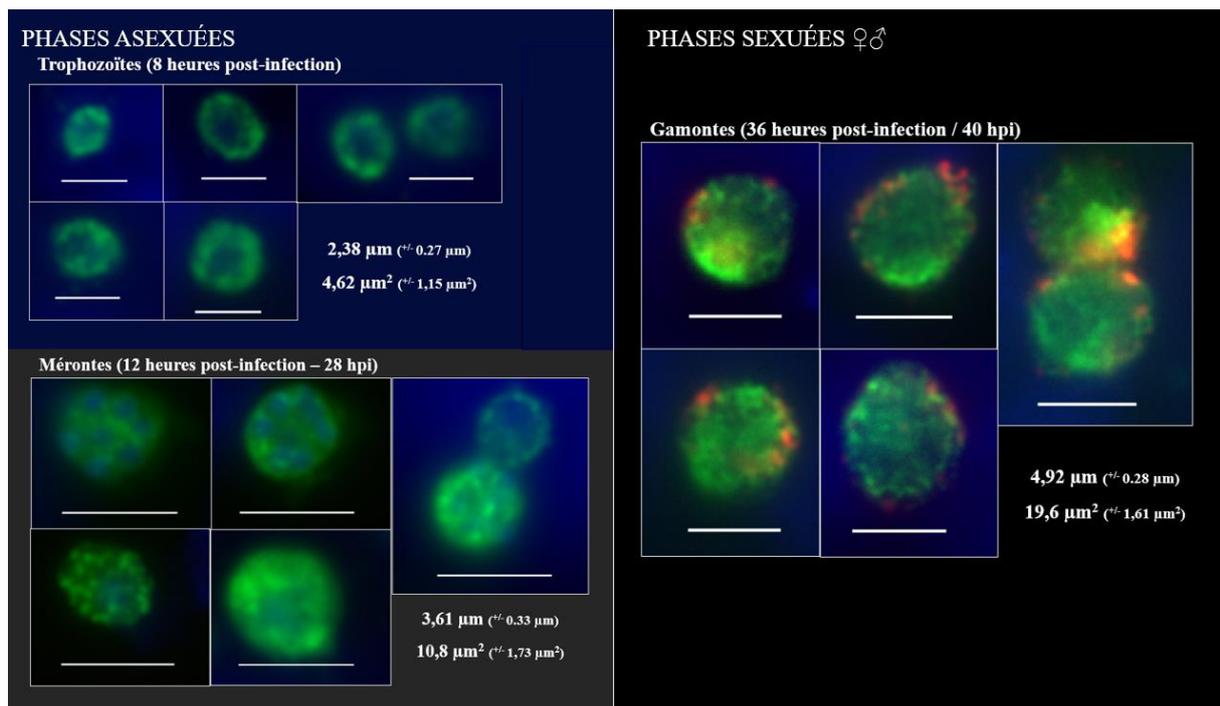


Figure 21 : Phases asexuées et sexuées du cycle de vie de *C. parvum*. Phases asexuées : trophozoïtes, début d'apparition au temps 8 heures post-infection (barre d'échelle 2 μm) et mérontes dès 12 h pi jusqu'à 28 h pi (barre d'échelle 4 μm). Apparition des phases sexuées entre 36 et 40 h pi : gamontes (barre d'échelle 4 μm). Gx1000.

3.4 Analyse des images microscopiques par StarDist (plugin Fiji)

Pour analyser les images de cellules infectées par *C. parvum*, le logiciel Fiji a été employé. Il s'agit d'un logiciel *Open Source* spécialisé dans le traitement et l'analyse d'images biologiques (*Schindelin et al., 2012*) comprenant plusieurs *plugins* dont le *plugin StarDist* qui est un outil de reconnaissance de formes et notamment celle des noyaux cellulaires (*Schmidt et al., 2018*).

StarDist prédit la forme des objets en formant un polygone convexe étoilé pour chaque pixel (*Figure 22*).

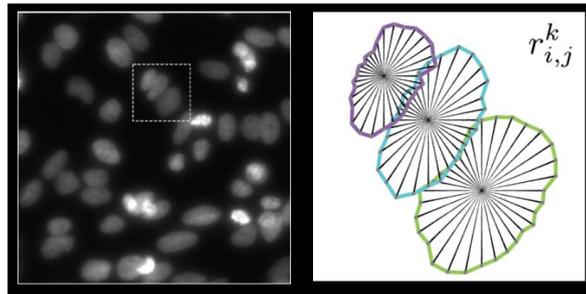


Figure 22 : Reconnaissance des formes par des polygones convexes en étoile.

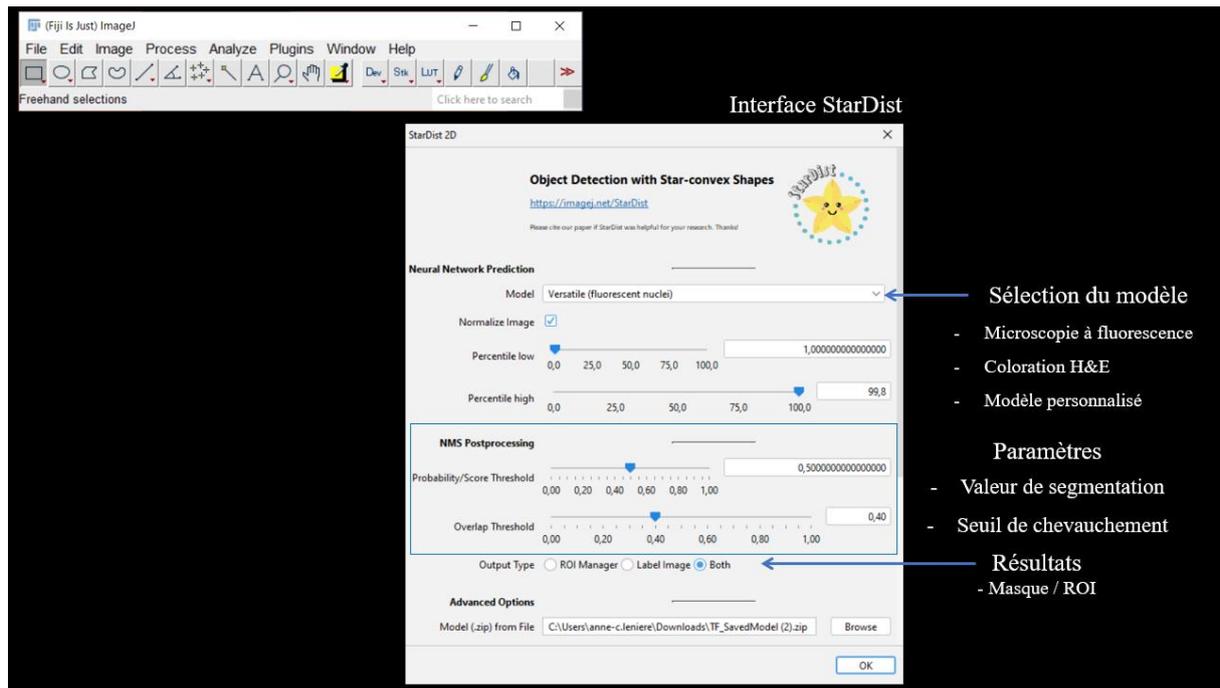


Figure 23 : Interfaces du logiciel Fiji/Image J et du plugin StarDist.

Plusieurs modèles pré-entraînés à la détection de noyaux issus d'images fluorescentes ou issus de coloration H&E (*Hématoxyline/Eosine*) peuvent être utilisés. Il est également possible d'utiliser un modèle personnalisé par l'utilisateur et qui peut être exporté sous la forme d'un fichier .zip dans les options avancées. Seuls deux paramètres doivent être ajustés : « *Probability/Score Threshold* » qui concerne la quantité d'objets segmentés (un ratio proche de 1 conduit à moins d'objets segmentés et évite les faux-positifs) et « *Overlap Threshold* » qui concerne le chevauchement des objets (plus le ratio est proche de 1 plus les objets vont se chevaucher). Néanmoins, chaque modèle pré-entraîné possède des paramètres optimisés par défaut. Les objets segmentés peuvent être générés sous la forme d'un « masque » (Figure 24C) et synthétisés dans le *ROI manager* (*Regions of Interest*). *ROI manager* permet de gérer les objets détectés et d'obtenir des informations sur chaque objet (nombre, aire, périmètre, intensité de fluorescence, etc.).

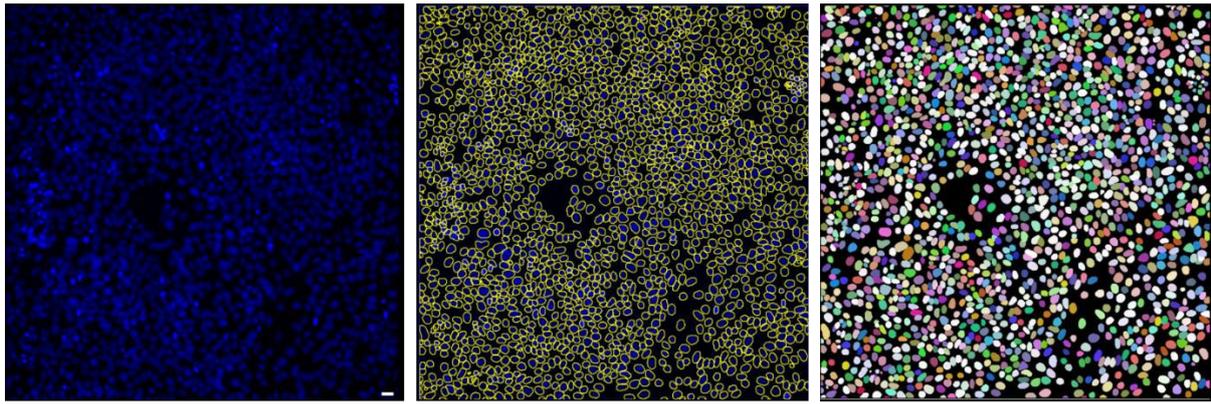


Figure 24: Exemple de segmentation avec StarDist. (A) Noyaux cellulaires colorés au DAPI en bleu. (B) Reconnaissance et segmentation des noyaux cellulaires. (C) Masque associé à la segmentation des noyaux cellulaires (Gx200 ; barre d'échelle 20 μm)

Les données morphométriques de chaque parasite détecté avec StarDist sont enregistrées (dénombrement et surface μm^2).

4. Quantification parasitaire par *real-time* qPCR

4.1 Préparation des échantillons de cellules infectées par *C. parvum* au format 96 puits

Après 48 h d'infection, le surnageant des cultures infectées par *C. parvum* est récupéré puis le tapis cellulaire est rincé une fois avec du PBS avant de déposer de la trypsine 0.25% afin de décoller les cellules. Après vérification microscopique, le tapis cellulaire est récupéré et les échantillons sont centrifugés 10 min à 10 000 g. Le culot est repris dans 200 μL de PBS 1X et les échantillons sont stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation pour l'extraction d'ADN.

4.2 Réalisation de la gamme d'oocystes

Des dilutions en série à partir d'une suspension d'oocystes *C. parvum* pure ont été réalisées à partir d'une solution mère de 5.10^5 oocystes (5.10^5 - 1.10^5 - 5.10^4 - 1.10^4 - 5.10^3 - 1.10^3 oocystes). Les six tubes de dilution ont ensuite subi une série de trois chocs thermiques (Azote/ 37°C – 1 min 30 s/étape) pour faciliter l'extraction d'ADN.

4.3 Extraction de l'ADN de *C. parvum*

L'extraction de l'ADN génomique de *C. parvum* a été effectuée en utilisant le kit de purification Purelink™ Microbiome (Invitrogen™) en utilisant le protocole fourni par le fabricant et destiné aux échantillons issus de milieux de culture (*Microbial Culture and Transport Media Samples*). Brièvement, les échantillons ont été mis en suspension dans un tube contenant des microbilles et du tampon de lyse. Après une première lyse chimique (10 min à 65°C), les échantillons vont subir une lyse mécanique grâce

à des microbilles et une étape d'agitation horizontale sur un vortex (15min). Une étape de centrifugation permet de récupérer le surnageant contenant l'ADN puis plusieurs étapes de lavages vont être effectuées avant l'étape de capture de l'ADN sur colonne. L'ADN purifié est élué dans 100 µL de tampon puis dosé au *NanoDrop* et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation pour la qPCR.

4.4 Real-time qPCR

Cinq microlitres d'ADN (issus des 100 µL initiaux) sont utilisés pour réaliser la qPCR. La courbe standard permettant de quantifier le parasite (*Figure 21*) a été effectuée en utilisant la gamme de concentration croissante en oocystes afin d'obtenir une corrélation entre les valeurs de CT et le Log de concentration. Le coefficient de corrélation R^2 était de 0.9 (n=3 expériences indépendantes, chaque point de gamme a été déposé en triplicata pour réaliser la moyenne des CT).

Le gène *COWP* (*GenBank n° AF248743*) est amplifié par qPCR en suivant le protocole décrit précédemment (*Guy et al.,2003*)

Gènes	Séquences
Amorce Foward COWP 702	5'- CAAATTGATACCGTTTGTCCCTTCTG -3'
Amorce Reverse COWP702	5'- GGCATGTCGATTCTAATTCAGCT - 3'
Sonde COWP 702	5'- HEX/TGCCATACATTGTTGTCTGACAAATTGAAT/BHQ-1 - 3'

Tableau 3 : Séquences des amorces et sonde utilisées pour amplifier le gène *COWP* de *C. parvum*

L'amplification est réalisée dans un volume final de 25 µL en utilisant le *Master Mix 2X, LightCycler 480 Probes Master* (Roche) avec 500 nM de chaque amorce et 200 nM de sonde.

Réactifs	Par échantillon (volume en µL)
Master MIX (2X)	12,5
H ₂ O DNase free	4,95
Amorce Forward 10 µM (Cf = 0,5 µM)	1,25
Amorce Reverse 10 µM (Cf = 0,5 µM)	1,25
Sonde 100 µM (Cf = 0,2 µM)	0,05
ADN	5
Volume final	25

Tableau 4 : Préparation du mélange réactionnel destiné à l'amplification du gène *COWP* par qPCR.

Chaque échantillon est analysé en triplicata en incluant un contrôle négatif où l'ADN a été remplacé par de l'eau exempte de nucléase. La PCR quantitative est réalisée sur le thermocycleur *CFX96* (BioRad) par une première étape d'activation à 95°C pendant 10 min suivie de 40 cycles d'amplification

(comprenant une phase de dénaturation 95°C, 10 sec et une phase d'élongation à 60°C pendant 1 min) et se termine par une phase de refroidissement à 40°C pendant 30 sec.

Le logiciel *BioRad CFX manager* est ensuite utilisé pour analyser les données. Tous les échantillons dont les valeurs de CT étaient ≥ 40 ont été considérés comme négatifs. La quantification a ensuite été basée sur la courbe standard et les valeurs obtenues ont été multipliées par 20 (correspondant à la taille de la prise d'essai : 5 μ L d'ADN utilisés parmi les 100 μ L extraits).

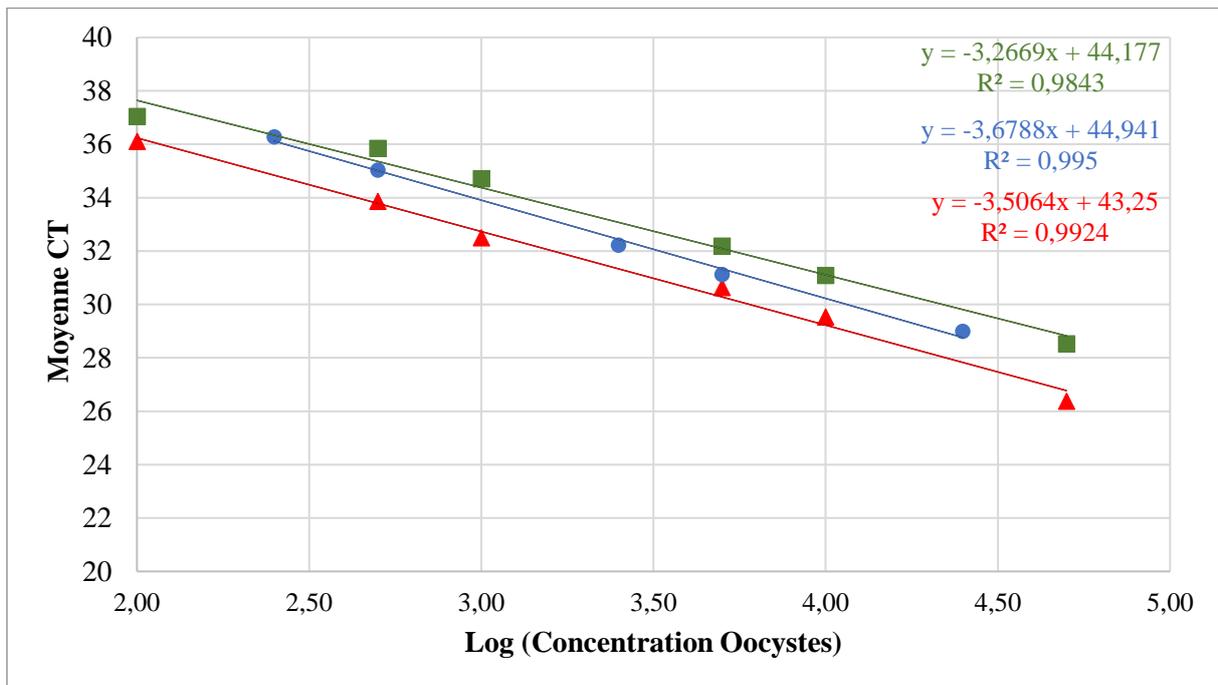


Figure 25 : Réalisation de 3 gammes standards de concentration d'oocystes de *C. parvum*. Trois expériences indépendantes et chaque point de la gamme a été déposé en triplicata.

5. Analyse par spectroscopie d'impédance

5.1 Présentation du prototype 1 électrode



Il s'agit d'une électrode commerciale interdigitée de forme rectangulaire en platine d'une largeur d'électrode et d'un espacement de 5 μ m (*Metrohm Dropsens*) de dimensions : 1 22.8 x L 7,6 x H 0.7 mm sur laquelle a été fixé un puits de 6 mm en *polyméthylsiloxane* (PDMS) réalisé à l'aide d'un emporte-pièce.

Le PDMS a été élaboré à partir d'un ratio 10 :1 de PDMS en phase liquide et d'agent durcisseur pour permettre la polymérisation. Le mélange a été réalisé automatiquement au *Thinky Mixer* selon les paramètres suivants : durée d'une minute à 2000 rpm et 30 kPa. Le mélange est ensuite moulé dans une boîte de Pétri et placé à l'étuve pendant 2 h à 70°C. Une fois solidifié, des puits de 6 mm sont

réalisés dans le PDMS. Avant le dépôt du PDMS sur l'électrode, celui-ci est nettoyé à l'éthanol 70% pendant 15 min.

Le prototype (*Figure 26*) a été placé dans une boîte de Pétri avec une coupelle d'eau stérile pour saturer l'environnement et limiter tout risque d'évaporation. Finalement un couvercle réalisé en PDMS a été placé sur le puits de culture.

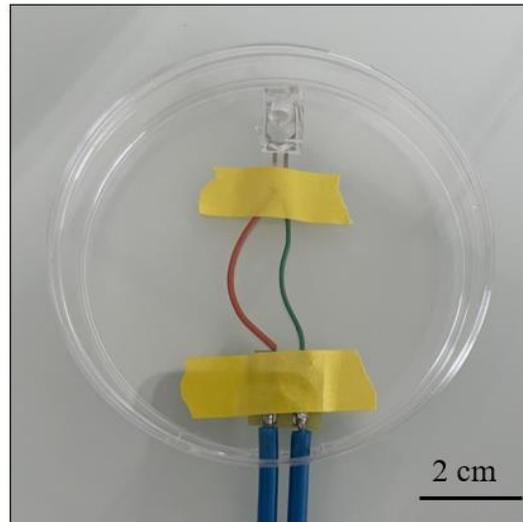


Figure 26 : Prototype 1 électrode

5.2 Présentation du dispositif 10 électrodes

Ce dispositif (*Figure 27*) permet de suivre dix expériences en parallèle dont la conception a été réalisée par Charlène BRILLARD (Ingénieure d'étude rattachée au projet). Le but était d'optimiser l'ensemble des paramètres de mesure impédimétrique avant de passer vers une version standard 96 puits.

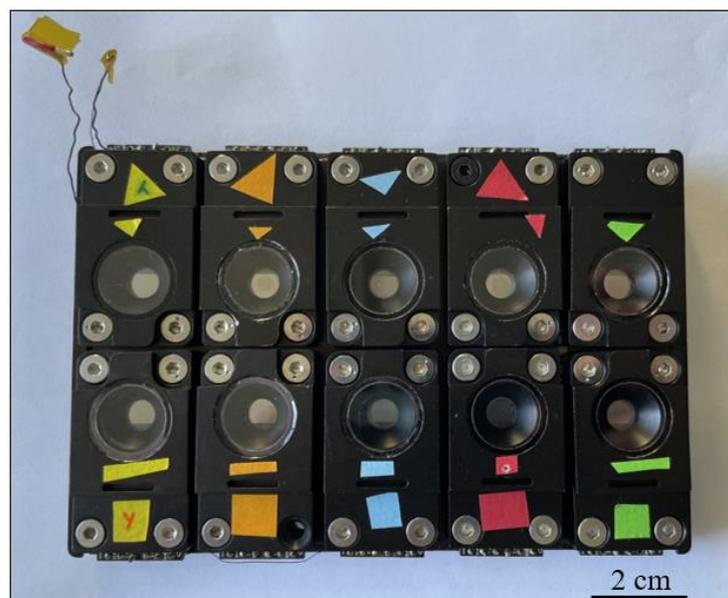


Figure 27 : Dispositif 10 électrodes

Ce dispositif inclut comme précédemment pour le prototype 1 puits, des électrodes planaires interdigitées commercialisées par la société *Metrohm*. Ce système modulable est compatible avec les tailles standards de portoirs retrouvés sur les platines de microscope. Le *design* et la taille des puits ont pour objectif de se rapprocher des conditions expérimentales retrouvées sur une plaque standard 96 puits. Les dix chambres de culture sont entièrement démontables afin de faciliter leur nettoyage et leur stérilisation (éthanol 70%, 15 min). Pour cela les chambres reposent sur leur support par l'intermédiaire d'aimants qui permettent aussi un positionnement précis au niveau des connecteurs électriques. Ces derniers assurent la liaison entre le réseau d'électrodes et la *lock-in* par une nappe de câblages. Un système de visserie permet ensuite de fixer et stabiliser les connexions entre les chambres et le support des chambres. Le dispositif comporte enfin une fenêtre d'ouverture sous chaque chambre pour permettre à la fois l'analyse par spectroscopie d'impédance et par microscopie inverse (Gx400).

Les mesures ont été effectuées avec la Lock-in MFLI (*Zurich Instruments*) qui couvre la gamme de 100 Hz jusqu'à 500 kHz.

5.3 Représentation des données

L'impédance étend le concept de résistance aux circuits de courants alternatifs et possède à la fois une amplitude et une phase. En effet, la loi d'Ohm définie la résistance comme étant le rapport entre la tension U et le courant I selon la formule : $R = U/I$. Or, dans le cas d'un courant alternatif, le rapport U/I n'est plus une constante et l'équivalent de la résistance en courant alternatif est appelé Impédance (Z).

La méthode de représentation choisie pour caractériser les solutions tampons est le diagramme de Bode qui permet de représenter à la fois l'amplitude de l'impédance (Ω) et la phase (radians) en fonction de la fréquence. Il permet ainsi de quantifier l'amplitude de l'impédance et de la comparer à la phase qui renseigne sur le comportement du système : inductif (90°), résistif (0°) ou capacitif (-90°).

En ce qui concerne la croissance cellulaire et les infections par *C. parvum*, les changements observés au cours du temps ont été représentés par l'amplitude de l'impédance uniquement. De même, pour pouvoir comparer les expériences, l'amplitude de l'impédance a été représentée sous forme de valeurs normalisées par rapport à $t=0h$ selon la formule suivante :

$$|Z(t, f)|_{Norm} = \frac{|Z(t, f)|}{|Z(t = 0h, f)|}$$

5.4 Acquisition des données impédimétriques

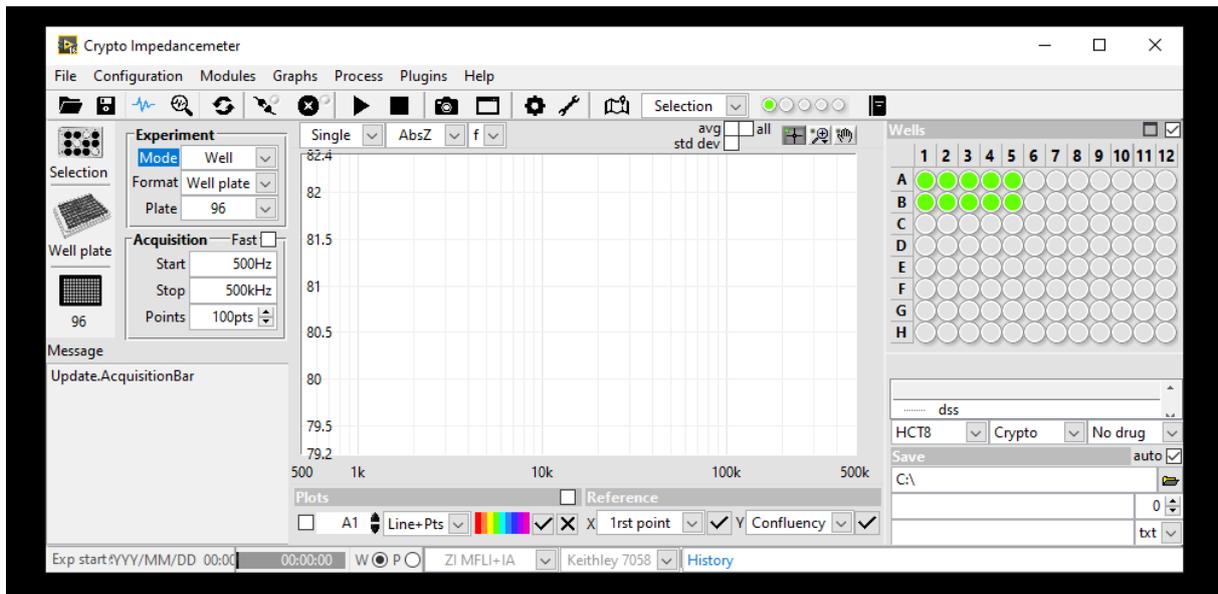


Figure 28 : Interface du logiciel LabView

Une interface simplifiée programmée sous *LabView* par C. Brillard a été conçue pour l'acquisition des données et permet de programmer les paramètres de mesure en fonction du nombre de puits (de 1 à 96 puits) sur une gamme de fréquences de 100 Hz à 500 kHz. La variation de l'impédance en fonction du temps peut être analysée pour chaque fréquence sélectionnée avec un intervalle d'environ 1 min entre chaque point de données.

5.5 Lavage des électrodes

Avant chaque utilisation, les électrodes sont désinfectées à l'éthanol 70% pendant 15 min et manipulées sous le poste de sécurité microbiologique. Dans le cas où l'électrode n'a pas été en contact avec le parasite *C. parvum*, le nettoyage s'effectue une nuit avec de la trypsine 0,25% afin de décoller les résidus cellulaires. Ensuite, l'électrode est laissée une journée dans de l'eau désionisée et placée à l'étuve 37°C. Avant chaque réutilisation, des observations microscopiques (Gx400) sont effectuées pour s'assurer de la propreté des électrodes.

Dans le cas où l'électrode a été en contact avec *C. parvum* celle-ci n'est plus réutilisée, l'électrode est fixée au méthanol et séchée complètement avant d'être stockée à -20°C.

6. Statistiques

Les données ont été représentées par la moyenne associée à l'écart-type.

Pour déterminer la viabilité cellulaire, le test non paramétrique de Mann-Whitney a été réalisé (seuil de significativité $p < 0,05$).

Résultats – Discussion

Partie 1 – Choix du modèle cellulaire

Les premiers tests ont été effectués dans le but de déterminer le choix du modèle cellulaire parmi les cellules HCT-8 qui représentent le modèle de référence pour l'étude du parasite *Cryptosporidium* et le nouveau modèle récemment découvert : les COLO-680N (Miller *et al.*,2018). Une étude comparative a donc été réalisée afin de visualiser les niveaux d'infection par microscopie et par qPCR des deux lignées cellulaires en utilisant trois protocoles d'infections différents. Le premier protocole d'infection est celui utilisé en routine au sein du laboratoire (*protocole I*) ; le second (*protocole II*) est une adaptation du protocole décrit dans l'article de référence (Miller *et al.*,2018) et le troisième (*protocole III*) est une alternative au *protocole II*, qui provient également des auteurs utilisant les COLO-680N.

Comme le montre la *Figure 29*, après 48 heures post-infection, un développement intracellulaire important du parasite *C. parvum* peut être visualisé pour les HCT-8 en utilisant le protocole I alors qu'un très faible taux d'infection peut être observée dans les COLO-680N.

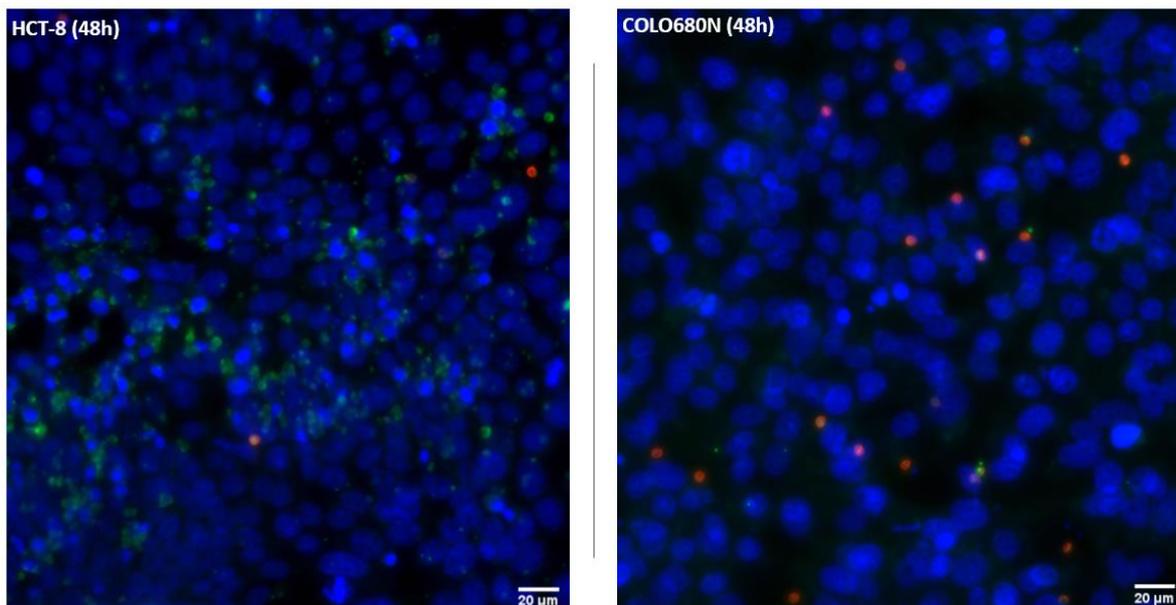


Figure 29 : Infection des cellules HCT-8 et COLO680N avec C. parvum (Iowa) au temps 48h post-infection (x400). Marquage des oocystes en rouge et des formes intracellulaires du parasite en vert.

Nous avons au préalable testé le protocole décrit par Miller *et ses collaborateurs* (2018) mais aucune infection n'a été obtenue aussi bien dans les HCT-8 que dans les COLO-680N. Une adaptation du protocole a donc été effectuée en réduisant le temps d'incubation des oocystes lors du désenkystement, passant alors de trois heures à 1 heure d'incubation (*protocole II*). Ce changement dans le protocole visait à réduire le risque d'altération des sporozoïtes nouvellement désenkystés.

Néanmoins, malgré cette modification et l'utilisation d'un troisième protocole, nous ne sommes pas parvenus à infecter les COLO-680N, même à des temps plus longs pouvant aller jusqu'à 8 jours d'infection comme le montre la *Figure 30*.

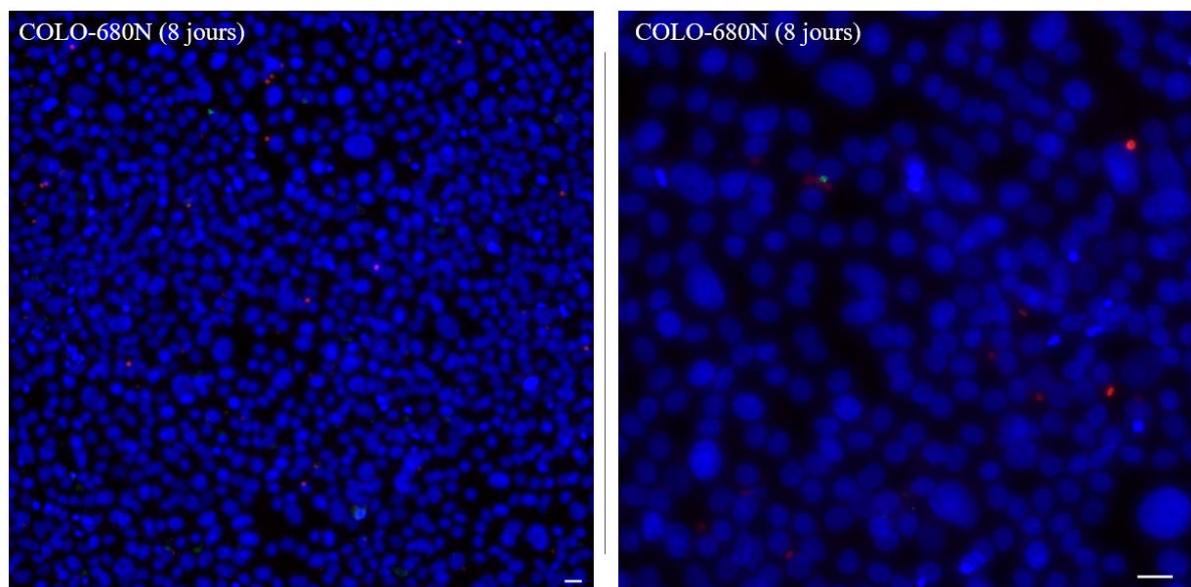
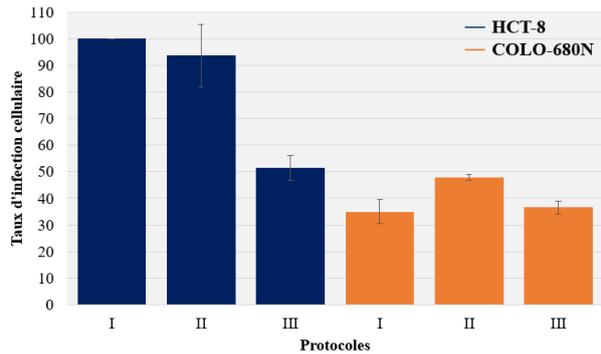


Figure 30 : 8 jours d'infection des cellules COLO-680N (Gx630 et Gx200). Barre d'échelle 20 μ m.

Des expériences réalisées par nos partenaires Anglais de l'*Université d'East Anglia* (Norwich, UK) ont montré qu'il existait une grande variabilité au niveau des taux d'infection des COLO-680N par *C. parvum* en fonction du format des puits de culture utilisés. En effet, leurs résultats (non publiés) ont montré des taux d'infection plus importants lorsque les expériences étaient réalisées en flasque (25cm²) ou en plaque 6 ou 12 puits de culture (9,6 cm² et 3,5cm²). Des infections en plaque 12 puits de culture ont donc été réalisées avec les cellules HCT-8 et COLO-680N pendant 48 heures afin de quantifier les niveaux d'infection par qPCR en fonction des trois protocoles. Comme présentés dans la *Figure 31*, la comparaison de l'infection par rapport au modèle HCT-8 (*protocole I*) présente des niveaux d'infection supérieurs dans les cellules HCT-8 avec 93,7% contre 47,7% dans les COLO-680N en utilisant le *protocole II* et 51,5% contre 36,5% avec le *protocole III*.



Protocole	Milieu désenkystement	Durée
I	0,025% trypsine dans de l'eau acide pH 2.4	20min
II	100µL 0,05% trypsine-EDTA + 400µL 0,5% hypochlorite de sodium	60min
III	0,75% acide taurocholique 0,25% trypsine dans du PBS	60 à 75min

Figure 31 : Evaluation du taux d'infection de *C. parvum* par qPCR dans les cellules HCT-8 et COLO-680N en appliquant trois protocoles différents. Les taux d'infection sont exprimés en fonction de l'infection des HCT-8 (protocole I) qui sert de référence.

Conclusion

Un problème majeur dans la recherche sur *Cryptosporidium* est le manque de système cellulaire *in vitro* facilement manipulable et reproductible, permettant un développement complet du parasite avec la formation de nouveaux oocystes infectieux. Bien que le modèle HCT-8 soit le plus utilisé, un blocage au niveau de la fécondation a récemment été mis en évidence (Tandel *et al.*, 2019), ce qui empêche l'obtention du cycle complet et la formation des oocystes. Ce cycle incomplet explique l'utilisation des cellules limitée à quelques jours avec un pic d'infection situé entre 48 et 72 heures. Néanmoins, les HCT-8 ont permis d'acquérir de nouvelles connaissances sur les interactions cellule hôte-parasite (Hashim *et al.*, 2006) ainsi que sur l'identification de molécules dirigées contre les cryptosporidies. Des recherches ont été entreprises dans le but de développer des systèmes *in vitro* mimant davantage les conditions physiologiques du développement de *C. parvum*. Dans ce contexte, Morada *et son équipe* (2016) ont permis de cultiver le parasite *C. parvum* pendant plus de six mois avec une production continue d'oocystes pouvant atteindre 10^8 oocystes par jour. Néanmoins, il s'agit d'un système complexe utilisant des fibres creuses et des environnements dont la teneur en oxygène varie, rendant son utilisation très coûteuse et limitant son acquisition dans les différents laboratoires. Un système de culture tridimensionnelle à base de protéines de soies poreuses a permis d'obtenir une monocouche cellulaire hautement polarisée similaire à l'épithélium retrouvé dans l'intestin. L'infection par *C. parvum* a duré 17 jours avec un développement complet du parasite associé à une faible production d'oocystes (DeCicco RePass *et al.*, 2017). D'autres études se sont focalisées sur l'utilisation d'organoïdes (Heo *et al.*, 2018) mais la quantité des oocystes néosynthétisés à partir de ces structures 3D était inférieure à celle obtenue à partir des modèles animaux. Dans l'ensemble, bien que ces systèmes 3D permettent de palier au problème de réplique sexuelle du parasite, ils ne sont pas adaptés aux expériences haut débit nécessaires au développement de molécules thérapeutiques ni à une approche électrique comme celle que nous cherchons à développer. Ainsi, les cellules COLO-680N représentaient une option intéressante dans le fait qu'elles soient facilement manipulables et qu'elles permettaient d'obtenir une production

continue d'oocystes infectieux (*Miller et al.,2018*). Ces données encourageantes nous ont conduit à réaliser des tests comparatifs entre les cellules HCT-8 et cellules COLO-680N infectées par *C. parvum*. Comme le montre les analyses d'immunofluorescence, nous n'avons pas été en mesure de reproduire les résultats prometteurs attendus avec les COLO-680N, malgré l'utilisation de trois protocoles d'infection différents.

Ces résultats divergents de ceux précédemment publiés posent la question de la reproductibilité entre les laboratoires. Une étude Allemande a également échoué à infecter les COLO-680N de façon continue en testant plusieurs protocoles, confirmant nos résultats. En effet, les auteurs ont observé une diminution de la prolifération parasitaire dès le deuxième jour d'infection (*Vélez et al.,2021*). On peut signaler que dans notre cas, la souche *Iowa* a été utilisée alors que celle de *Miller et al.,2018* était la souche *Moredun*. De même, *Vélez et son équipe* ont utilisé la souche *Köllitsch* (IIaA15G2RI). Pour vérifier que l'absence d'infection n'était pas liée à une erreur de protocole ou à un effet de souche, les expérimentations ont été effectuées directement dans le laboratoire de l'*Université du Kent à Canterbury* (UKC) où avait été réalisés les travaux de *Miller*, sans pour autant réussir à infecter les cellules COLO-680N. À la suite d'une discussion avec le directeur du laboratoire (Dr. Anastasios TSAOUSIS) il s'est avéré qu'il y avait deux lots de COLO-680N (un lot issu d'une collaboration avec une équipe Allemande qui avait donné lieu à la publication de *Miller* et un lot directement commandé dans une banque de cellules). Ce point souligne la possibilité soit d'une dérive génétique de la lignée COLO-680N ou d'une contamination dans le lot originaire d'Allemagne qui pourrait être constitué de deux types cellulaires différents. Ces hypothèses sont en cours de vérification par séquençage des deux lots cellulaires au laboratoire de l'UKC.

De plus en plus de données tendent à montrer que les lignées cellulaires décrites dans les publications, peuvent contenir des contaminations avec d'autres lignées cellulaires ou être mal identifiées (pour revue voir *Hughues et al.,2007*). Cette contamination des lignées cellulaires par d'autres lignées est connue depuis les années 50. Sur la base des cellules soumises aux principales banques de stockages (ATCC, ECACC), il y aurait ainsi entre 18% et 36% des cellules qui seraient contaminées ou mal identifiées.

De même, il convient de vérifier avant tout usage des lignées cellulaires, l'absence d'agents contaminants tels que les mycoplasmes qui sont particulièrement difficiles à observer et provoquent des altérations majeures de la cellule à l'origine de biais expérimentaux. C'est d'ailleurs pour cela que nos lots de cellules ont été testés par méthode PCR pour s'assurer de l'absence de mycoplasme. De plus, les niveaux des passages sont rarement indiqués dans les protocoles. Or l'utilisation de cellules à des passages très élevés participe à générer des erreurs liées notamment à la dérive génétique des cellules. Ainsi, des lignées cellulaires maintenues trop longtemps en culture présenteraient un métabolisme ou des fonctions clés qui pourraient être altérés. Ces cellules seraient alors très éloignées des modèles cellulaires référencés à l'origine dans les publications.

Une première conclusion que l'on peut tirer de cette expérience est que le choix du modèle cellulaire à la base de notre système de détection est important car il doit être sensible au parasite. Il faut également être en mesure de s'assurer que l'origine de la lignée utilisée n'introduit pas de biais dans l'expérimentation. Ce constat est d'autant plus important dans la conception d'un dispositif destiné à être mis à disposition de la communauté scientifique et qui utilise ses propres sources de cellules. En effet, pour garantir la reproductibilité des analyses effectuées entre les laboratoires, il faudra être en mesure de vérifier l'origine des lignées cellulaires employées.

Enfin, à défaut d'obtenir la lignée COLO-680N fonctionnelle permettant d'obtenir la production d'oocystes, seules les cellules HCT-8 ont été utilisées dans la suite des expériences puisqu'elles présentaient des taux d'infection plus élevés.

Partie 2 – Évaluation de l'efficacité de la paromomycine par des méthodes standards

Le but de cette seconde partie est de comparer les méthodes employées pour appréhender l'efficacité de la paromomycine en modèle *in vitro*. Pour ce faire, deux méthodes couramment utilisées dans le criblage de molécules thérapeutiques ont été testées : la microscopie et l'analyse moléculaire. Cette étape avait pour objectif de donner un point de comparaison quant à l'efficacité de la spectroscopie d'impédance à détecter l'activité anticryptosporidies de nouveaux composés thérapeutiques. Enfin, cette partie visait à automatiser l'analyse par microscopie en vue de la coupler par la suite, à l'analyse électrique elle-même automatisée.

2.1 Évaluation de l'efficacité de la paromomycine par microscopie

2.1.1 Détermination de la cytotoxicité de la paromomycine

L'efficacité de la paromomycine a été déterminée par microscopie de fluorescence en quantifiant la présence du parasite *C. parvum* en fonction de doses croissantes en paromomycine. Toutefois, avant de réaliser ce test, la cytotoxicité de la paromomycine a été analysée sur les cellules HCT-8. Pour cela, des concentrations croissantes de paromomycine (0,0625 – 0,125 – 0,250 – 0,5 – 1 mg/mL) ont été ajoutées durant 48 heures et l'effet cytotoxique de la paromomycine a été visualisé en utilisant le marquage *Syto9* / *iodure de propidium (PI)*. Ce marquage permet de colorer en rouge les cellules mortes dont la membrane perméable laisse entrer l'iodure de propidium alors que les cellules vivantes non perméables, seront colorées en vert par le *Syto9* qui est un colorant traversant la membrane. Dix images par puits ont été prises au grossissement x400 (*Figure 32*) avant de quantifier la viabilité des cellules présentée dans le *Tableau 5*.

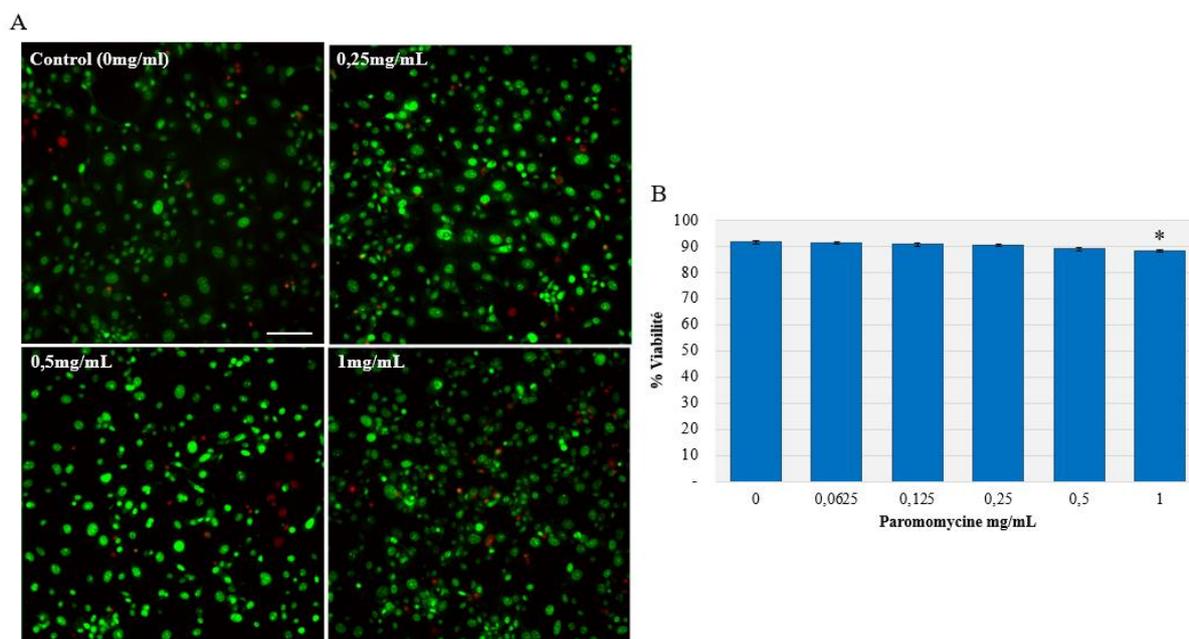


Figure 32 : Détermination de la cytotoxicité de la paromomycine sur les cellules HCT-8 traitées pendant 48 heures en utilisant le marquage Syto9/PI. (A) Observation microscopique - Barre d'échelle 100 μ m (x400). (B) Pourcentage de viabilité ($p < 0,05$; test Mann-Whitney)

Paromomycine (mg/mL)	0	0,0625	0,125	0,25	0,5	1
% Viabilité HCT-8	91.64	91.33	90.78	90.40	89.04	88.42

Tableau 5 : Pourcentage de viabilité cellulaire en fonction de doses croissantes de paromomycine.

Comme le montre le [Tableau 5](#) et en accord avec les données de la littérature ([Gargala et al.,2000](#) ; [Downey et al.,2008](#)), aucune cytotoxicité particulière n'a été détectée jusqu'à 1mg/mL de paromomycine. C'est à partir de cette dose que les premiers effets modérés de cytotoxicité ont pu être visualisés.

2.1.2 Détermination de l'IC₅₀ par quantification automatique de *C. parvum* sur la base du plugin *StarDist* (Fiji)

La quantification parasitaire a été réalisée en analysant les images fluorescentes grâce au logiciel *Fiji* et plus particulièrement en utilisant le plugin *StarDist*. Ainsi, les cellules HCT-8 ont d'abord étéensemencées sur une lame de microscope et infectées avec des oocystes de *C. parvum*. Une gamme de concentrations croissantes de paromomycine (2X) a été ajoutée au milieu de culture à 4h post-infection pour obtenir une concentration finale de 1X. Après 48h d'infection, les cellules ont été fixées et les parasites ont été marqués en vert par l'utilisation d'anticorps fluorescents (Sporo-Glo-FL™). Dix images par puits ont été prises au grossissement x400 pour être analysées avec le plugin *StarDist*. Comme le montre la [Figure 33](#), le plugin *StarDist* permet de repérer les parasites *C. parvum* en détectant la

fluorescence verte émise. Bien que ce plugin soit initialement employé pour la détection des noyaux cellulaires de forme arrondie, les parasites également de forme arrondie sont bien reconnus.

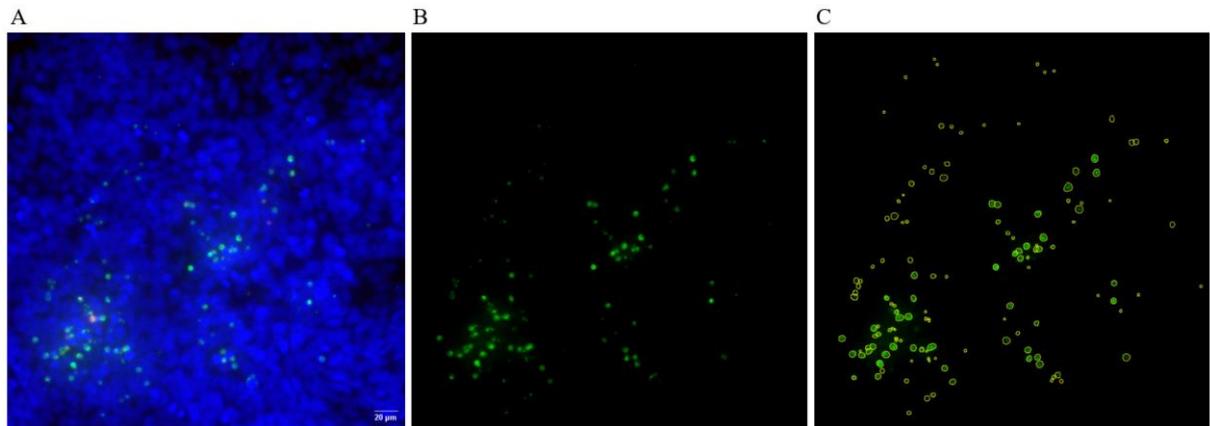
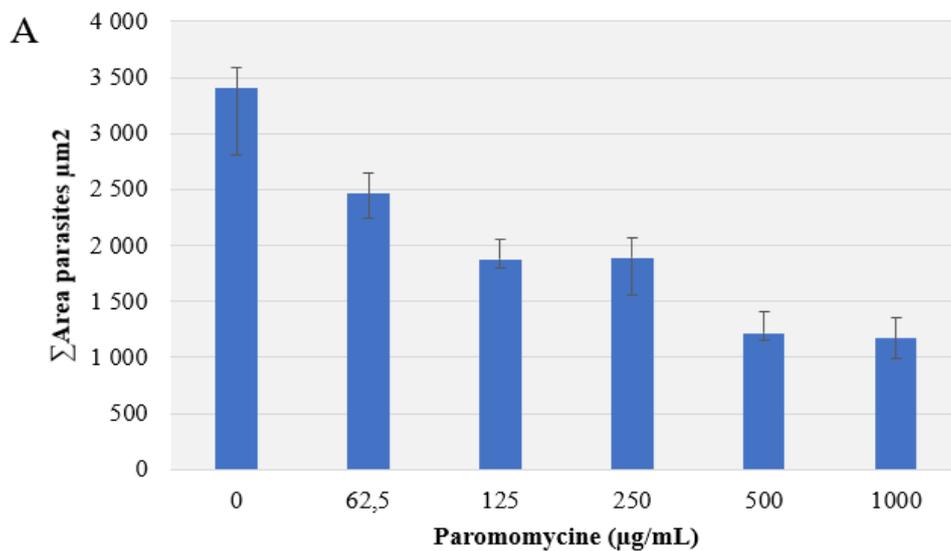


Figure 33 : Analyse des cellules infectées par *C. parvum* en utilisant le plugin StarDist. (A) Image initiale HCT-8 infectées dont les noyaux ont été colorés au Hoechst (bleu), les parasites intracellulaires en vert et les oocystes en rouge. (B) Canal vert isolé. (C) Détection des parasites par StarDist. G x400.

Ce mode d'analyse nous a permis d'acquérir les données morphométriques de chaque parasite détecté avec notamment la surface des parasites (Figure 34A) ainsi que la quantification de *C. parvum* en fonction de doses croissantes de paromomycine (Figure 34B).



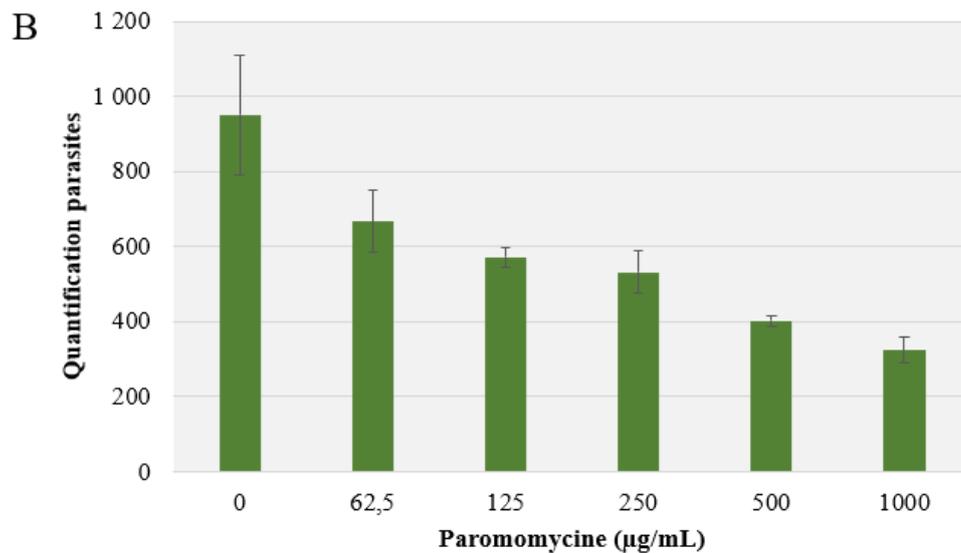


Figure 34 : Efficacité de la paromomycine au temps 48 heures post-infection(A) Somme des aires du parasite *C. parvum* et (B) nombre de parasites détectés avec le plugin StarDist. 10 images analysées/puits ($n=3$) moyenne +/- écart-type.

Ces résultats présentent un effet dose-dépendant de la paromomycine et un pourcentage d'inhibition de la croissance de *C. parvum* a pu être calculé à partir de la détection des surfaces du parasite aux différentes concentrations de paromomycine (Figure 34A). Ainsi, une Concentration Inhibitrice médiane (CI_{50}) de 357 µg/mL a été trouvée au temps 48 heures post-infection (Figure 35) avec des pourcentages d'inhibition du développement de *C. parvum* compris entre 29,1% à 62,5µg/mL et 66,3% à 1000 µg/mL.

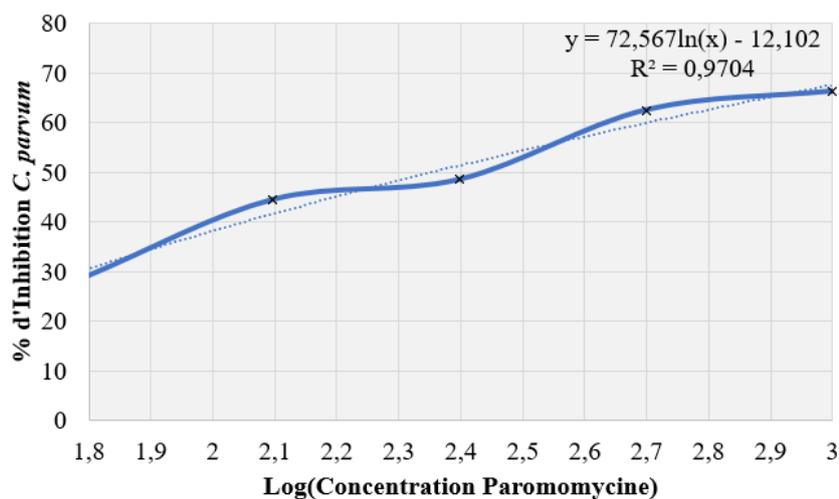


Figure 35 : Détermination de la CI_{50} de la paromomycine à 48h post-infection par méthode microscopique.

Cette expérience a également été réalisée au temps 72 heures post-infection (Figure 36) où une valeur de CI_{50} de 261 µg/mL a pu être déterminée. De même, cette CI_{50} plus faible a été associée à des taux

d'inhibition plus élevés avec 90% à 1000 µg/mL contre 66,3% au temps 48 heures. Toutefois, la forte inhibition à 1000 µg/mL pourrait être corrélée à une diminution de la viabilité cellulaire puisque l'évaluation de la viabilité au co-marquage Syto9/PI avait présenté une diminution légère mais significative de la viabilité cellulaire.

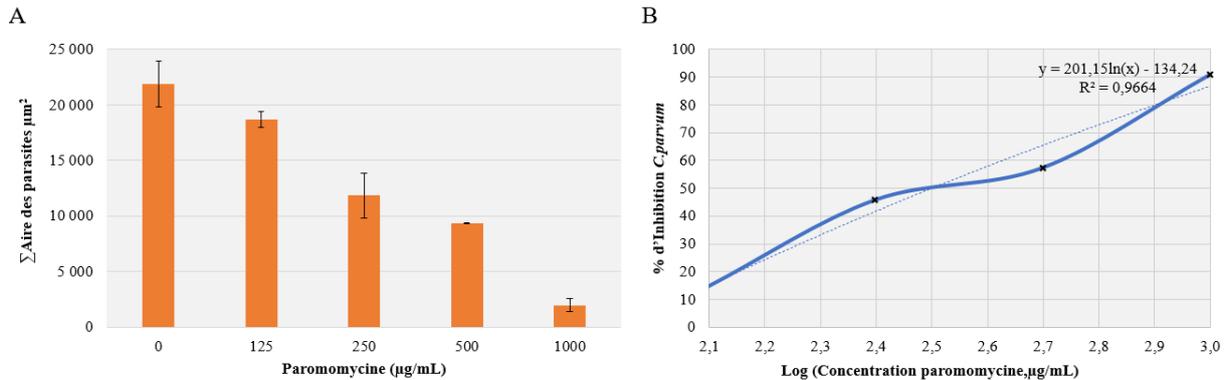


Figure 36 : Efficacité de la paromomycine au temps 72 heures post-infection (A) Somme des aires du parasite *C. parvum* et (B) : Détermination de la CI_{50} de la paromomycine à 72h post-infection par méthode microscopique. 10 images analysées/puits (n=3) Moyenne +/- écart-type

De plus, les données morphométriques obtenues par *StarDist* après 48 et 72 heures d'infection ont permis d'obtenir des informations sur la taille des parasites détectés (μm^2) en fonction des doses croissantes de paromomycine (Figure 37). Des tailles ont pu être attribuées aux différentes phases de *C. parvum* (formes libres – intracellulaires asexuées et intracellulaires sexuées) après observation et détermination des stades en microscopie au grossissement x630.

La distribution des tailles après 48 h d'infection (37A) montre que la majorité des formes détectées à ce temps appartient aux phases asexuées avec une forte proportion de trophozoïtes. De plus, une importante inhibition du développement parasitaire peut être observée après traitement par la paromomycine, aussi bien sur les formes intracellulaires asexuées (de 63,1 % - 51,3% - 59,3% - 61,8% et 74,2 %) que sur les formes intracellulaires sexuées (de 56,4% à la dose la plus faible jusqu'à 89,2% pour la dose la plus élevée).

En ce qui concerne les résultats au temps 72 h d'infection (37B), une sexualisation de la reproduction du parasite peut être observée avec un effet inhibiteur de la paromomycine (qui est surtout visible sur les stades sexués).

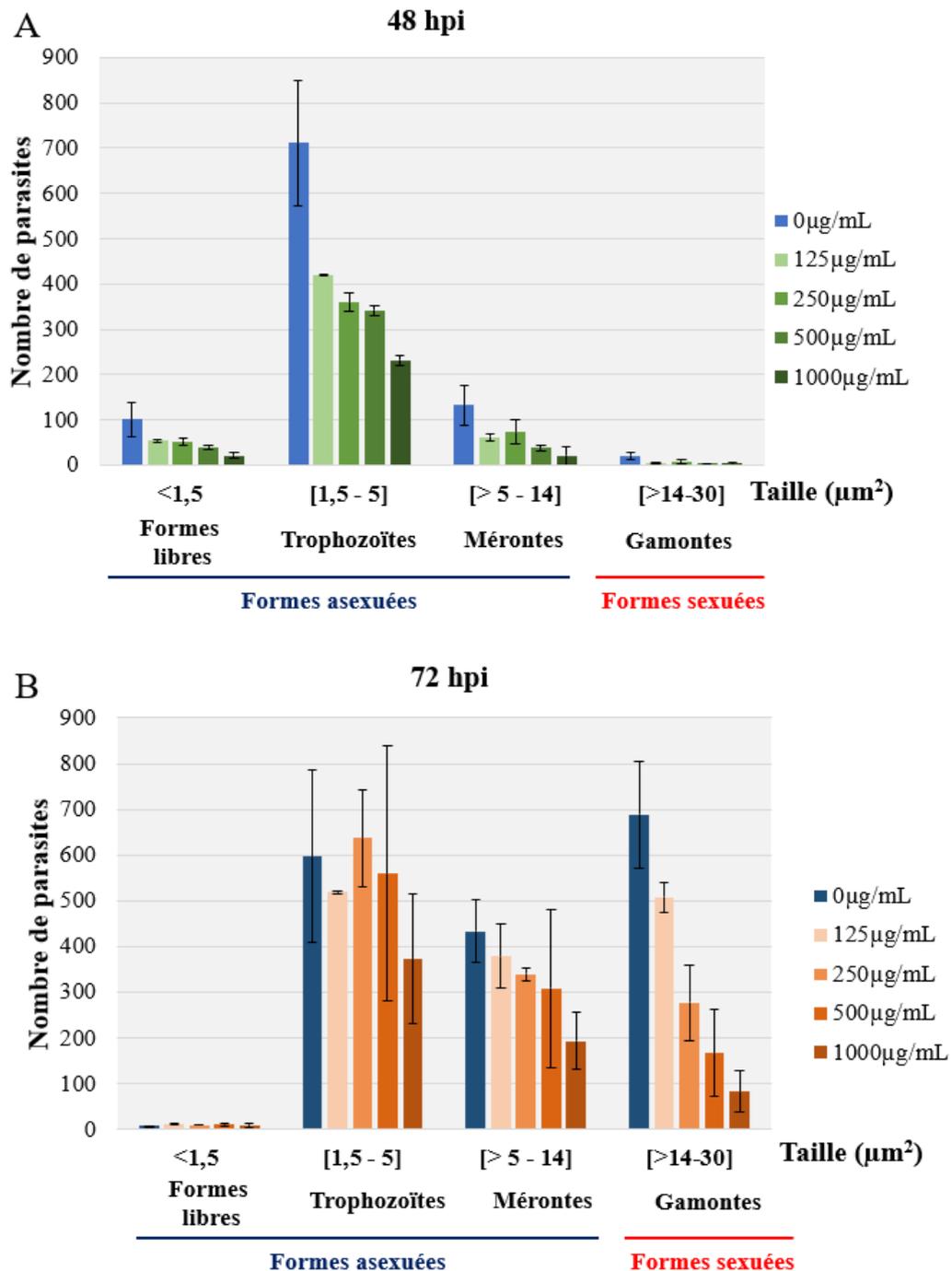


Figure 37 : Distribution de l'aire des parasites (μm^2) aux temps 48 heures post-infection (A) et 72 heures post-infection (B) en fonction des doses croissantes de paromomycine. 10 images analysées/puits. Représentation de la moyenne des trois puits avec écart-type.

Conclusion

En comparant ces résultats avec ceux de la littérature, on remarque que plusieurs méthodes de quantification parasitaire par microscopie ont été utilisées pour déterminer l'efficacité de la paromomycine en modèle *in vitro*. En effet, *Perkins et ses collaborateurs (1998)* ont obtenu une CI_{50} de

85 μM (52,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) après 48 heures d'infection dans les cellules Caco-2. Ce résultat a été obtenu en comptant manuellement les stades intracellulaires de *C. parvum* à l'aide d'un anticorps fluorescent spécifique et une inhibition maximale de 55% a été atteinte à 400 μM (246,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Une autre technique plus récente consiste à quantifier l'intensité de la fluorescence émise par les parasites après immunomarquage. Cette méthode a été employée par *Li et ses collègues (2019)*, afin d'évaluer l'efficacité de la paromomycine dans les cellules HCT-8 infectées par *C. parvum* durant 48h et 72 h à des concentrations variables jusqu'à 1000 μM (615,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Une inhibition dépendante de la concentration a été remarquée aux temps 48 h et 72 h avec des valeurs de CI_{50} de 400 μM (246,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et 450 μM (277 $\mu\text{g}/\text{mL}$) respectivement.

Ainsi, nos résultats sont cohérents avec les valeurs publiées dans la littérature que ce soit par une méthode de quantification manuelle, ou par une quantification de l'intensité de fluorescence émise par le parasite. L'approche microscopique développée avec le plugin *StarDist* est une méthode simple, rapide et efficace. Bien que l'algorithme ait été entraîné à reconnaître des noyaux cellulaires, nous avons obtenu de bons résultats en quantifiant la surface totale du parasite détectée par *StarDist*. Pour ce qui est du dénombrement des objets détectés par *StarDist*, une distinction indépendante des parasite *C. parvum* agrégés entre eux était plus difficile et des erreurs de comptage ont été remarquées, expliquant pourquoi la quantification des surfaces était plus adaptée et a permis de régler ce problème.

De même, en utilisant l'algorithme de *StarDist*, il est possible de développer son propre modèle de détection afin d'obtenir une détection plus précise des parasites de l'espèce *C. parvum*. Le développement d'un modèle de reconnaissance automatisée spécifique repose avant tout sur la création d'un *dataset labélisé*, autrement dit, il faut indiquer à l'algorithme ce qu'il doit reconnaître sur les images en procédant par une étape de *segmentation*. La segmentation des images est l'étape la plus laborieuse car elle nécessite d'annoter avec précision l'objet à identifier. Après cette étape de segmentation, un *Masque* est généré pour entraîner le modèle. Un premier test a été entrepris afin de créer un modèle plus performant dans la reconnaissance du parasite *C. parvum* (*Figure 38*). En effet, nous avons remarqué que pour la détection de faible densité parasitaire, notamment à forte doses de paromomycine, la détection était beaucoup plus complexe. Ainsi, une trentaine d'images a été utilisée pour entraîner *StarDist* et comme le montre la *Figure 38*, une amélioration au niveau de la détection peut être remarquée avec moins de faux positifs. Toutefois, ce modèle n'est pas optimal et dans le but de l'améliorer, un entraînement avec plus d'images sera réitéré, de même, pour augmenter la précision, le modèle sera entraîné avec plusieurs lots d'images provenant d'expérimentations différentes avec des densités parasitaires variables.

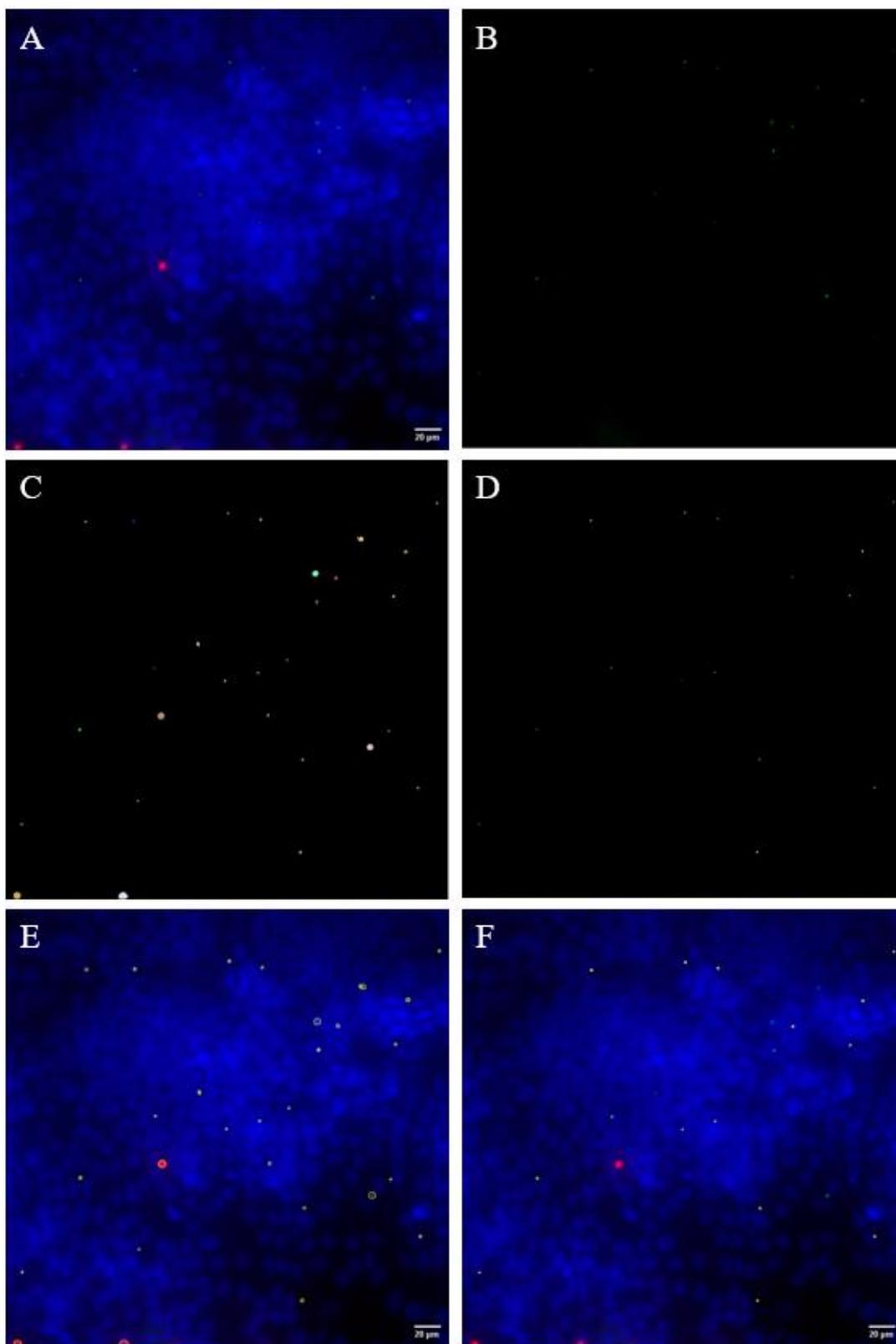


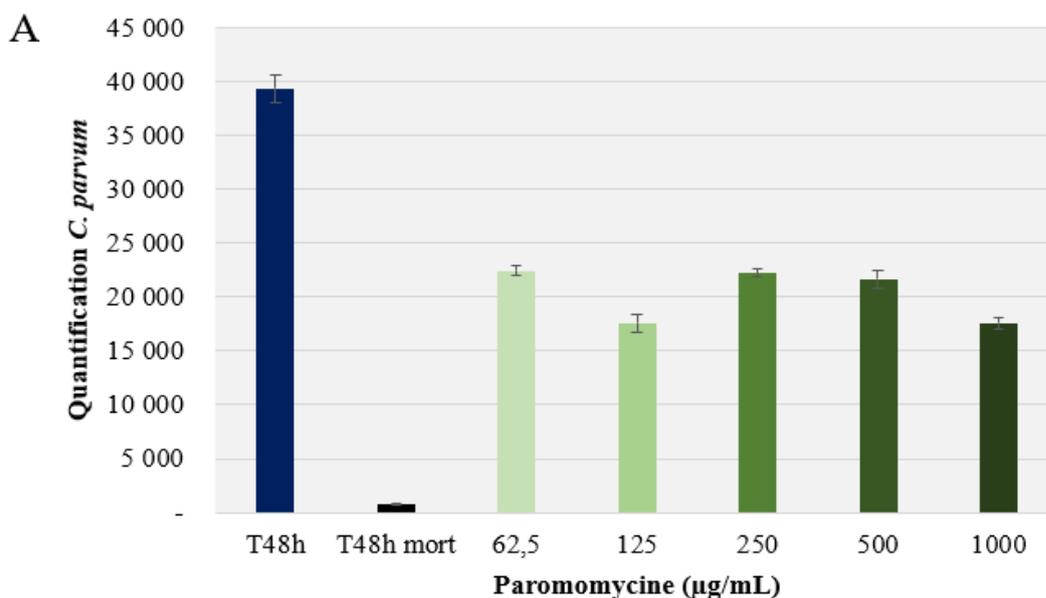
Figure 38 : Comparaison de la détection du modèle initial StarDist avec le nouveau modèle StarDist entraîné à reconnaître les parasites *C. parvum*. (A) Image initiale de cellules HCT-8 infectées. (B) Canal vert isolé (parasites). (C) Masque généré par le modèle initial StarDist et (D) par le nouveau modèle StarDist entraîné. (E) Segmentation des parasites détectés par le modèle initial StarDist et (F) par le nouveau modèle StarDist entraîné.

2.2 – Évaluation de l'efficacité de la paromomycine par analyse moléculaire

Pour valider les résultats obtenus par microscopie, des analyses moléculaires quantitatives ont été réalisées par qPCR en amplifiant le gène COWP de *C. parvum*.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits et cultivées jusqu'à confluence. Les cellules ont été infectées avec *C. parvum* pendant 48 heures. L'ajout de la gamme de paromomycine au temps 4 heures post-infection a été réalisé de deux façons : (1) sans rincer le tapis cellulaire, la solution de paromomycine 2X a été ajoutée directement pour obtenir une solution 1X ou (2) en rinçant le tapis cellulaire avant d'ajouter la solution de paromomycine 1X. Une infection contrôle a également été réalisée avec des oocystes inactivés par la chaleur.

Des résultats différents ont été obtenus en fonction des deux protocoles. En effet, la *Figure 39A* présente la quantification de l'ADN issu de *C. parvum* sans rinçage au temps 4 heures post-infection. L'effet inhibiteur de la paromomycine a bien été visualisé mais de façon surprenante son action n'était pas dose-dépendante puisque les pourcentages d'inhibition étaient de 43% aux doses 62,5µg/mL et 250 µg/mL ; 45% à 500 µg/mL et de 55% aux doses 125 µg/mL et 1000 µg/mL. En revanche, le rinçage du tapis cellulaire avant d'ajouter la paromomycine (*Figure 39B*) a permis d'obtenir une inhibition dose-dépendante avec des pourcentages d'inhibition du développement de *C. parvum* de 37,5% ; 43,6% ; 42,8% ; 52,8% et 74,2% respectivement pour chaque point de dilution de la gamme croissante de paromomycine ainsi qu'une CI_{50} de 382 µg/mL.



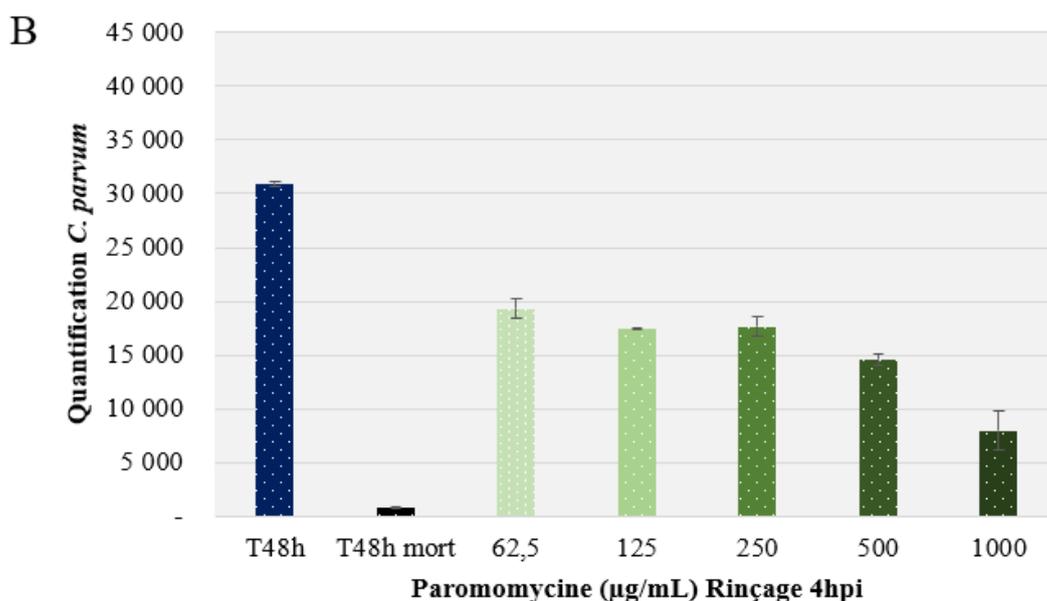


Figure 39 : Quantification de *C. parvum* par PCR quantitative à 48h post-infection en fonction de doses croissantes de Paromomycine (62,5 - 125 - 250 - 500 et 1000 µg/mL). Comparaison avec les cellules infectées pendant 48h sans paromomycine (T48h) et avec les cellules infectées avec des parasites morts (T48h mort). (A) Traitement sans rinçage à 4h post-infection et (B) avec rinçage à 4h post-infection.

En confrontant nos résultats obtenus par qPCR avec les données de la littérature, des résultats avec des CI_{50} plus faibles ont été observés. En effet, les travaux précédemment réalisés par *Cai et al., 2005* ont montré une CI_{50} de 77,5 µg/mL après 48 heures d'exposition à la paromomycine avec un taux d'inhibition très élevé (>95%) à une concentration de 810 µg/mL. Ces résultats ont également été confirmés par *Zhang et Zhu (2015)* avec une CI_{50} de 75,7 µg/mL.

Néanmoins, la méthode de quantification diffère de la nôtre puisque dans ces études l'ARN a été utilisé pour réaliser l'analyse moléculaire (qRT-PCR, *quantitative Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction*). Bien que cette méthode soit plus sensible, elle demeure néanmoins plus compliquée à mettre en œuvre puisqu'elle nécessite au préalable un pré-traitement avec une DNase afin d'exclure tout risque de contamination et un traitement de toutes les surfaces et consommables pour garantir leur statut RNase free. Cette différence pourrait expliquer la raison pour laquelle la CI_{50} déterminée au cours de nos expérimentations est cinq fois plus élevée.

Dans le cas où la quantification moléculaire a été réalisée sur de l'ADN, comme dans l'étude de *Shahiduzzaman et al., 2020* des taux d'inhibition similaires à nos résultats ont été observés. Leurs résultats ont présenté une inhibition du développement de *C. parvum* de 64,5% à 1 mg/mL contre 74,2% dans notre cas. De même, une étude menée par *Woolsey et ses collègues (2022)* ont obtenus des résultats variables en fonction du nombre d'expérimentation qPCR avec des pourcentages d'inhibition compris entre 77 et 90,7% à 500 µg/mL. Les auteurs attribuent cette variabilité à l'*inoculum* d'oocystes lors de l'ajout aux cellules et dont la quantité parasitaire ne peut pas être contrôlée et réalisée à chaque

expérience de façon reproductible (*Woolsey et al.,2022 ; Rochelle et al.,2002*). Ainsi, la variabilité des protocoles d'infection utilisés (méthode de quantification, temps d'incubation en présence de la paromomycine, lavage, *etc.*) et les diverses souches de *C. parvum* utilisées, contribuent à l'hétérogénéité des résultats retrouvés en fonction des études.

Cependant, en comparant nos données obtenues par qPCR avec celles de la microscopie, des résultats cohérents ont bien été obtenus pour les deux méthodes avec des pourcentages d'inhibition similaires (*Tableau 6*). Et une valeur de CI_{50} au temps 48 h équivalente entre les méthodes : 382 μ g/mL par approche qPCR et 357 μ g/mL par approche microscopique.

Concentration paromomycine (μ g/mL)	% d'inhibition de <i>C. parvum</i> (48 heures post-infection)	
	Microscopie	qPCR
62,5	29,1	37,5
125	44,5	43,6
250	48,6	42,8
500	62,5	52,8
1000	66,3	74,2

Tableau 6 : Comparaison du pourcentage d'inhibition de C. parvum déterminé par microscopie et par qPCR en fonction de doses croissantes de paromomycine après 48 heures d'infection.

3 – Évaluation de l'efficacité de la paromomycine par spectroscopie d'impédance

Enfin, dans l'objectif de caractériser la réponse électrique de cellules infectées par *C. parvum* et de visualiser l'effet de la paromomycine, un dispositif de mesure contenant dix puits de culture a été conçu en utilisant des électrodes commerciales interdigitées en platine. Néanmoins, avant d'utiliser ce dispositif, un prototype simplifié a été mis au point afin de déterminer si ces électrodes commerciales étaient adaptées aux mesures que nous souhaitons réaliser.

Les électrodes *Metrohm (Dropsens)* sont des électrodes interdigitées droites en platine d'une largeur et d'un espacement de 5 μ m. Ces électrodes ont été choisies en fonction de leur capacité à sonder un tapis cellulaire de quelques micromètres d'épaisseur. En effet, le champ de pénétration de ces électrodes peut être estimé selon les travaux effectués par *Linderholm (2006)* qui définit la profondeur de champ PC comme étant la hauteur à laquelle l'intensité du champ électrique est divisée par deux. De même, la profondeur de champ PC peut être calculée selon la formule suivante *Linderholm (2006)* :

$$p_c = \frac{L_{el} + E_{el}}{2} \sqrt{-1 - \left(\frac{L_{el}}{L_{el} + E_{el}}\right)^2 + 2 \sqrt{1 - \left(\frac{L_{el}}{L_{el} + E_{el}}\right)^2 + \left(\frac{L_{el}}{L_{el} + E_{el}}\right)^4}}$$

Avec les paramètres L_{el} (largeur d'électrode) et E_{el} (espacement des doigts) de 5 μ m, une profondeur de champ de 3,72 μ m a été déterminée.

Le but de ces expérimentations visait également à vérifier le bon fonctionnement du logiciel permettant le contrôle et l'acquisition des données impédimétriques.

3.1 Caractérisation du prototype 1 électrode

3.1.1 Détermination de la sensibilité des électrodes commerciales

Les premières expériences ont été consacrées au contrôle de la stabilité dans le temps et à la sensibilité des réponses électriques. Des tests de calibration ont donc été réalisés avec de l'eau désionisée (EDI) et des solutions de tampon phosphate (PBS, *Phosphate Buffer Saline*) à différentes concentrations (0.1X, 1X et 10X).

Comme le montre la *Figure 40*, des spectres d'impédance distincts ont été obtenus permettant d'identifier l'EDI des trois solutions de PBS. Le profil d'impédance de l'EDI présente trois parties spécifiques : La première partie de 100 Hz à 2 kHz montre une diminution rapide de l'amplitude avant de se stabiliser dans une seconde partie aux fréquences comprises entre 2 kHz et 20 kHz. Enfin, dans la dernière partie du spectre, l'impédance chute à nouveau fortement aux fréquences supérieures à 20 kHz jusqu'à 500 kHz.

Dans le cas des trois solutions de PBS plus conductrices en raison de leur concentration croissante en sels, les trois spectres se caractérisent dans une première partie par une diminution linéaire et rapide de l'impédance avant de se stabiliser dans une seconde partie jusqu'à 500 kHz. On observe également que la distinction des trois solutions est plus visible aux fréquences faibles (< 2 kHz).

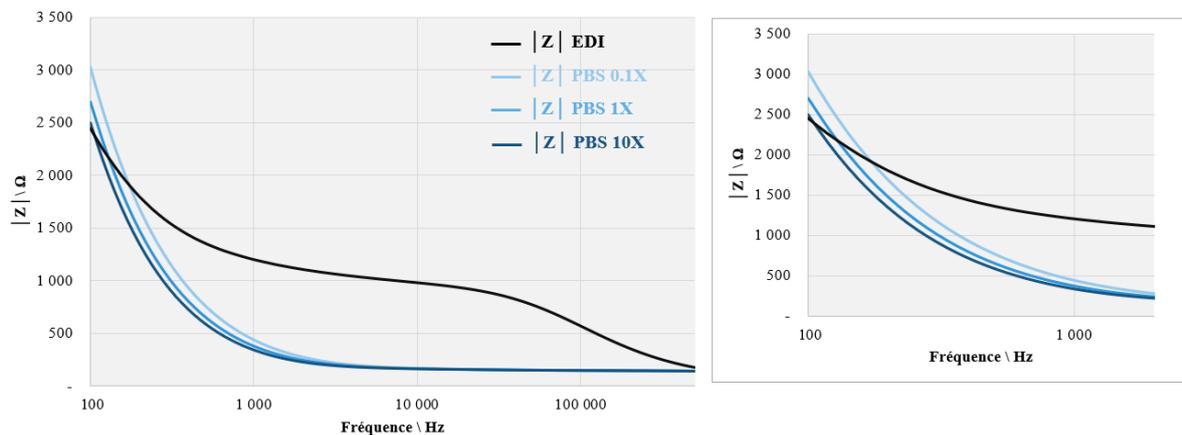


Figure 40 : Spectres d'impédance de l'eau désionisée (EDI) et d'une gamme de solutions de concentration croissante de PBS (Phosphate Buffer Saline) 0.1X - 1X et 10X enregistrés aux fréquences de 100 Hz à 500 kHz

La comparaison entre le spectre d'amplitude avec la phase (*diagramme de Bode*) permet d'apporter des renseignements sur le comportement du système en déterminant selon le degré de la phase le comportement résistif (Phase = 0°) ou capacitif (Phase = -90°).

Dans le cas de l'EDI (*Figure 41A*), alors que l'impédance diminue de 100 Hz à 2 kHz, la phase quant à elle, augmente d'une valeur de -33° (100 Hz) jusqu'à se stabiliser à -10° (5 kHz) en se rapprochant d'un comportement résistif. Dans la dernière partie, au-delà de 20 kHz, tout comme l'amplitude, la phase diminue jusqu'à atteindre une valeur de -51° (350 kHz) mais une légère augmentation de la phase peut être remarquée jusqu'à à 500 kHz (-46°). Concernant la solution de PBS 1X (*Figure 41B*), une diminution de la phase va être observée de 100 à 200 Hz pour finalement augmenter de -70° vers la valeur 0° .

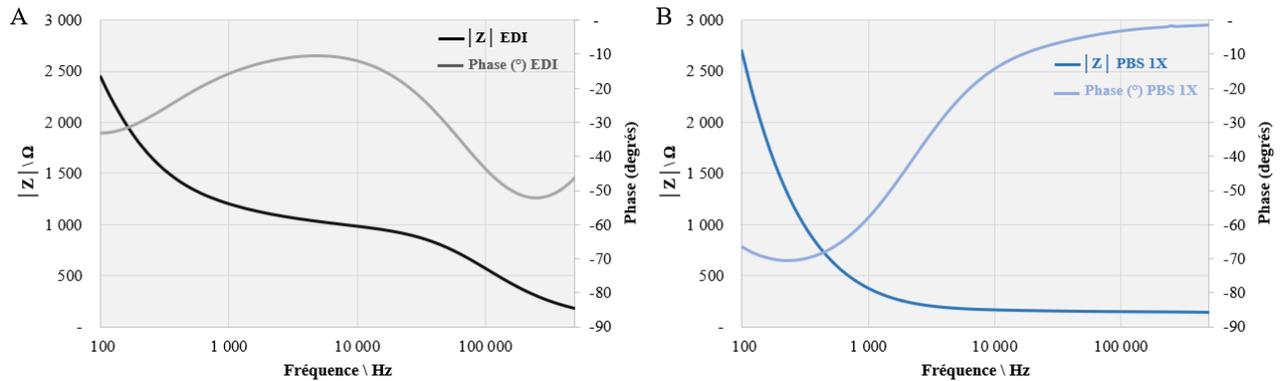


Figure 41 : Diagramme de Bode de l'eau désionisée (EDI) (A) et (B) du PBS enregistré aux fréquences de 100 Hz à 500 kHz.

Restitution du signal initial de l'EDI

Afin de rédiger un protocole détaillé, la qualité du nettoyage des électrodes après leur utilisation a été évaluée. Plusieurs rinçages à l'eau désionisée ont été effectués après une acquisition avec du PBS 1X. Comme le montre la *Figure 42*, trois rinçages n'ont pas été suffisants pour réobtenir le signal impédimétrique initial obtenu avec de l'eau désionisée. Des tests supplémentaires de 6 à 9 rinçages ont été nécessaires pour obtenir des électrodes propres.

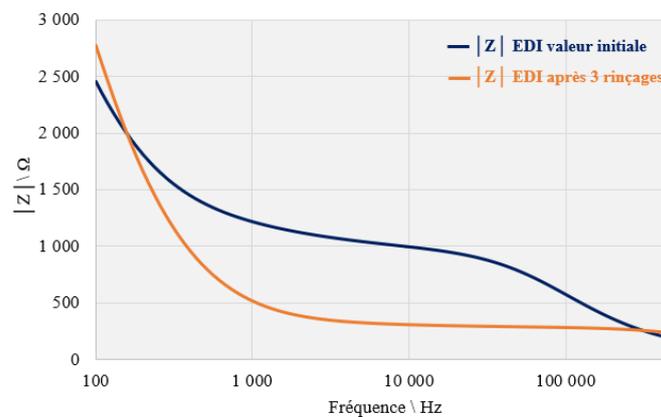


Figure 42 : Détermination de la sensibilité de l'électrode après nettoyage avec de l'EDI.

3.2 Détermination de la stabilité des réponses électriques du prototype

Avant d'entreprendre la croissance cellulaire des HCT-8 dans le prototype 1 électrode, la stabilité du signal impédimétrique a été vérifiée à long terme en effectuant une acquisition de 24 heures avec du milieu de culture cellulaire (RPMI 1640).

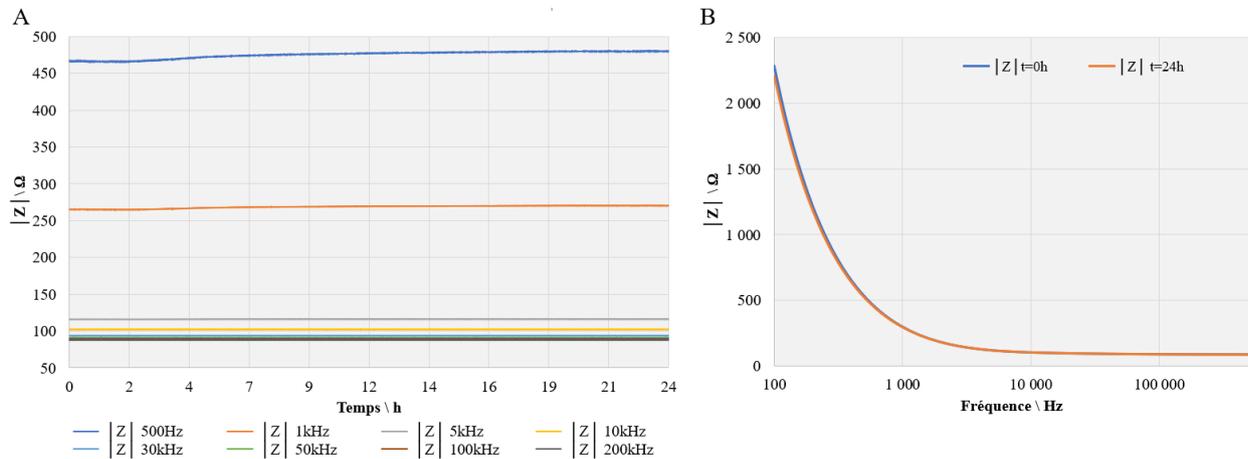


Figure 43 : Stabilité des mesures impédimétriques du milieu de culture RPMI-1640 durant 24 h d'acquisition. (A) Représentation des mesures à différentes fréquences de 500 Hz à 200 kHz. (B) Spectres d'impédance au lancement de l'acquisition ($t=0$ h) et à 24 h post-acquisition ($t=24$ h).

Comme le montre la *Figure 43*, la réponse impédimétrique a été relativement stable tout au long de l'expérience, à l'exception de faibles variations qui ont été observées aux fréquences inférieures à 1 kHz. En effet, une variation d'une dizaine d'Ohms a été enregistrée pour la fréquence 500 Hz passant de 478 Ω à 469 Ω . Au-delà de 1 kHz et jusqu'à 500 kHz, de très faibles fluctuations ($< 0,5$ Ω) ont été enregistrées montrant une réponse électrique stable durant 24 heures.

3.3 Croissance des cellules HCT-8 dans le prototype

Après vérification de la stabilité du signal, les tests de croissance cellulaire ont pu démarrer. Pour cela, 50 000 cellules HCT-8 ont été déposées dans le puits de culture dont la surface a été préalablement recouverte d'une protéine facilitant l'adhésion des cellules (fibronectine) et les réponses électriques ont été enregistrées pendant 28 heures de croissance aux fréquences comprises entre 100 Hz et 500 kHz. Pour faciliter la lecture des résultats et pour pouvoir comparer plusieurs expériences indépendantes, l'évolution des valeurs a été normalisée par rapport à $t_0=0$ h selon la formule suivante :

$$|Z(t, f)|_{Norm} = \frac{|Z(t, f)|}{|Z(t=0h, f)|}$$

L'impédance enregistrée au cours des 28 heures de croissance (*Figure 44A*) a montré un profil typique d'une courbe de croissance caractérisée par une augmentation rapide de l'impédance durant les deux

premières heures, correspondant à l'adhésion des cellules à la surface des électrodes, puis par une augmentation plus lente corrélée au développement des cellules jusqu'à la confluence marquée par une stabilisation du signal formant un plateau à partir du temps 24 heures de croissance.

De même, la comparaison de différentes croissances cellulaires a permis de distinguer les cellules dont la confluence a rapidement été atteinte en 24 heures de croissance avec une amplitude plus élevée par rapport aux cellules encore en cours de répllication et celles qui avaient une croissance ralentie. (*Figure 44B*). Ces variations au niveau de la vitesse de croissance des cellules pourraient être dues au niveau de repiquage. En effet, les *travaux de Dibao-Dina* ont permis de mettre en évidence l'influence du nombre de repiquage sur l'amplitude de l'impédance avec un nombre maximal de repiquage compris entre 14 et 24 pour assurer la reproductibilité des courbes de croissance.

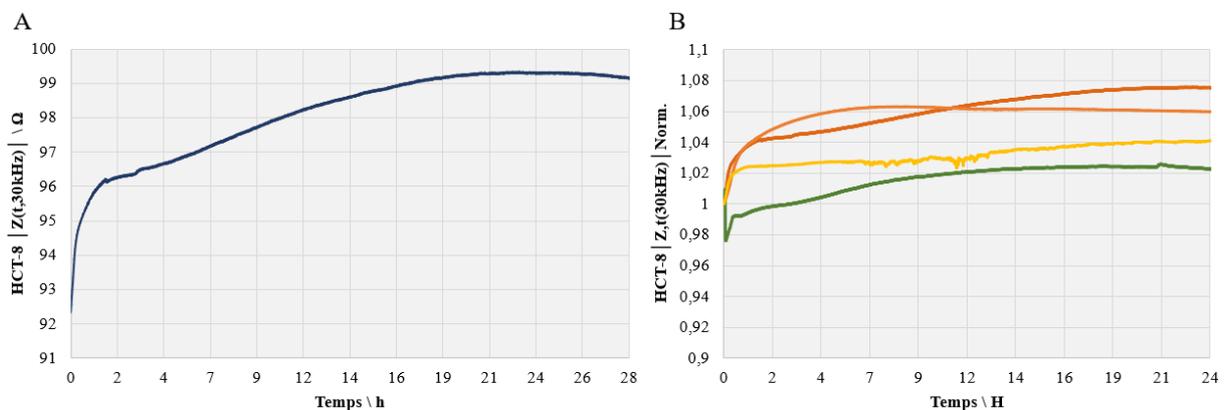


Figure 44 : Croissances cellulaires des HCT-8. (A) Données brutes à 30 kHz enregistrées pendant 28 h. (B) Quatre croissances cellulaires normalisées enregistrées à 30 kHz pendant 24 h. Les courbes en orange représentent les cellules dont la confluence a été atteinte, la courbe jaune montre les cellules encore en cours de développement et la courbe en vert présente une croissance ralentie des HCT-8.

3.4 Infection des cellules HCT-8 avec *C. parvum* dans le prototype

Les cellules HCT-8 ont étéensemencées, cultivées jusqu'à confluence et infectées avec de oocystes de *C. parvum* (Iowa). L'impédance a été enregistrée en continu pendant 24 heures à des fréquences comprises entre 100 Hz et 500 kHz. Après ces 24 heures de croissance cellulaire, le tapis confluent a été infecté selon le ratio 1 oocyste/cellule. Pour visualiser l'effet du parasite, une infection a également été effectuée avec des oocystes morts (= *inactivés*) servant de témoin négatif. L'infection a ensuite été suivie durant 24 heures et les résultats ont été normalisés au temps 6 heures post-infection (temps pour lequel peu de variations sont observées). La *Figure 45* montre qu'à 30kHz, il existe une différence d'amplitude notable entre les valeurs d'impédance des conditions témoins (milieu de culture et parasites morts) et les valeurs des cellules infectées avec le parasite. En effet, le milieu de culture RPMI-1640 présente un signal très stable tout au long de l'expérimentation avec des valeurs constantes égales à 1. Dans le cas des cellules infectées avec les oocystes inactivés, une diminution progressive des valeurs d'impédance

a été observée jusqu'à la fin de l'acquisition. Enfin, les deux courbes représentant les cellules infectées par *C. parvum* révèlent un aspect bien distinct des conditions témoins avec l'apparition d'une augmentation de l'impédance dès 9 h d'infection et jusqu'à une valeur maximale obtenue à 11 h. Toutefois, ces variations restent très faibles.

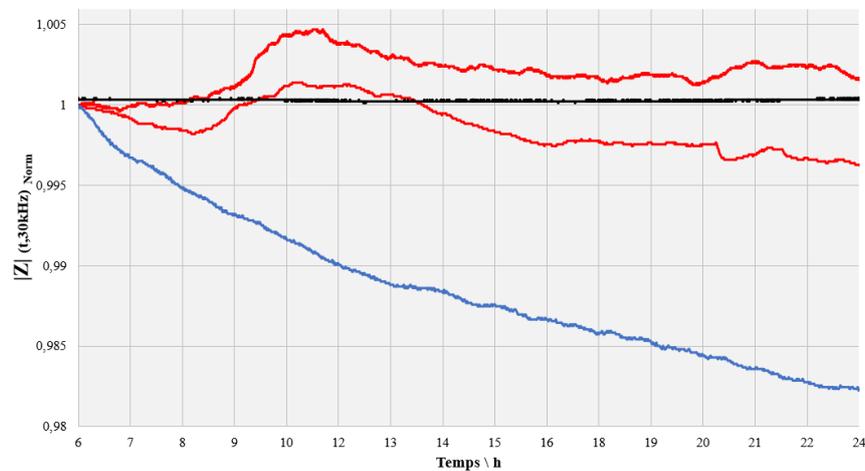


Figure 45 : Réponses impédimétriques normalisées des cellules HCT-8 infectées par *C. parvum* pendant 24 h en utilisant des électrodes interdigitées de 5 µm. Les courbes en rouges représentent deux expériences indépendantes d'infection ; la courbe en noir représente le milieu de culture et la courbe en bleu fait référence à une infection avec des parasites inactivés par une succession de chocs thermiques.

Ces résultats encourageants basés sur l'utilisation d'un prototype avec 1 seul puits d'analyse ont permis de mettre en avant la détection des croissances cellulaires et de visualiser une réponse singulière du tapis cellulaire infecté par rapport aux conditions contrôles. Toutefois, le format 1 puits ralentit considérablement le déroulé des expérimentations puisque chaque condition doit être réalisée successivement et cela empêche également de réaliser les expériences dans les mêmes conditions. Ainsi, le passage d'un dispositif comportant une électrode à un modèle comportant 10 électrodes a été effectué afin de réaliser dix expériences en parallèle.

4. Utilisation du dispositif 10 puits

Les premiers tests réalisés avec le dispositif 10 puits ont été entrepris dans le but de valider les résultats obtenus précédemment avec les électrodes 5 µm dans le prototype à un seul puit et de déterminer si en passant au format 10 puits on obtenait 10 répliques de chaque expérience. De même, les expériences visaient également le *design* et à optimiser les paramètres expérimentaux avant d'effectuer les expériences d'infection et les tests avec la paromomycine.

4.1 Test du dispositif avec de l'EDI et des solutions de PBS

Tout comme le prototype avec 1 seul puits, le dispositif 10 puits a été calibré avec de l'EDI et des solutions de concentration croissante en PBS. Le profil de réponse impédimétrique de l'EDI a bien été

retrouvé (*Figure 46A*) avec toutefois quelques fluctuations du signal au cours du temps. Une période de 30 min a donc été nécessaire pour obtenir un signal stable. De plus, comme le montre la *Figure 46B*, une différence a été visualisée entre les dix réponses impédimétriques de chaque puits. Cette observation peut être la conséquence d'une variabilité inter-électrodes lors de leur processus de fabrication ou, être due à un défaut de nettoyage avant leur utilisation.

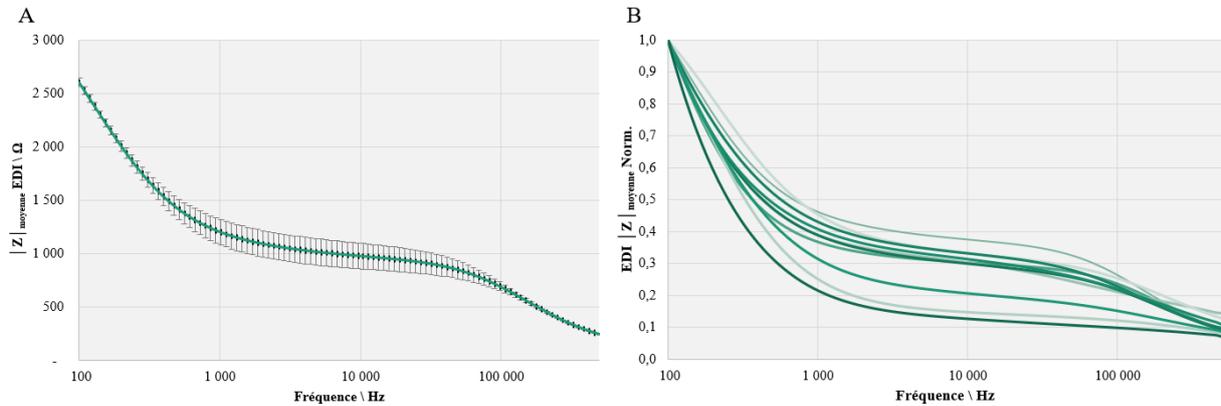


Figure 46 : Spectres d'impédance de l'EDI dans le dispositif 10 puits. (A) Représentation des données brutes pour un puits. (n=3, Moyenne +/- Ecart-type) (B) Normalisation de l'impédance de l'EDI dans les 10 puits.

Cette variabilité a également été remarquée en utilisant du PBS 1X (*Figure 47*) mais la normalisation des résultats a permis d'harmoniser l'ensemble des dix spectres, montrant qu'on obtenait bien les courbes telles que celles obtenues avec le dispositif 1 puits.

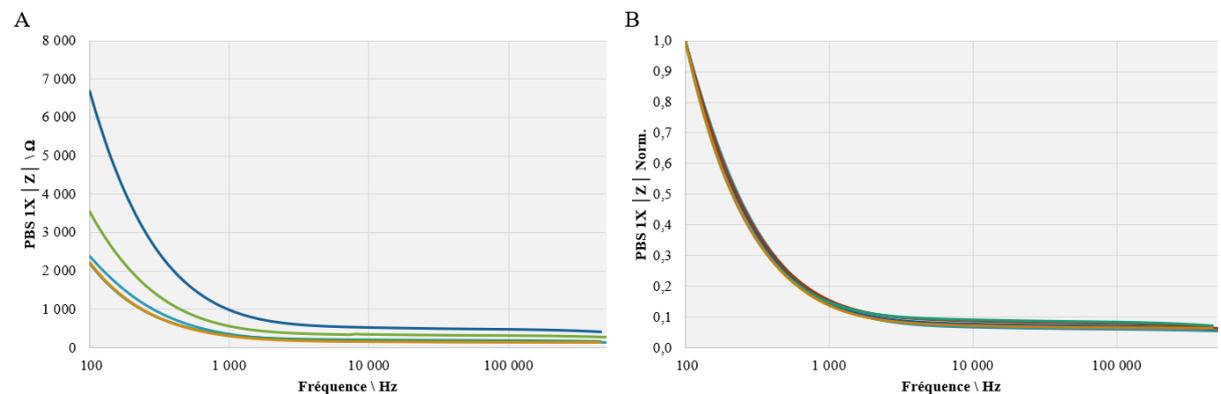


Figure 47 : Spectres d'impédance du PBS 1X enregistrés dans 5 des 10 puits du dispositif. (A) Données brutes et (B) Impédance normalisée à 100Hz.

4.2 Stabilité des mesures impédimétriques dans le dispositif 10 puits

Pour évaluer la stabilité des mesures impédimétriques, un protocole similaire à celui précédemment effectué avec le prototype a été entrepris en utilisant le milieu RPMI-1640 durant 24 heures. La *Figure 48* présente les valeurs d'impédance recueillies aux temps 1 heure et 24 heures post-acquisition aux fréquences 5 kHz, 10 kHz, 50 kHz et 100 kHz dans les différents puits de culture. A l'exception de deux

puits où les valeurs étaient plus élevées (puits n°2 et n°7), des valeurs similaires ont été retrouvées entre les puits de cultures (*Tableau 7*).

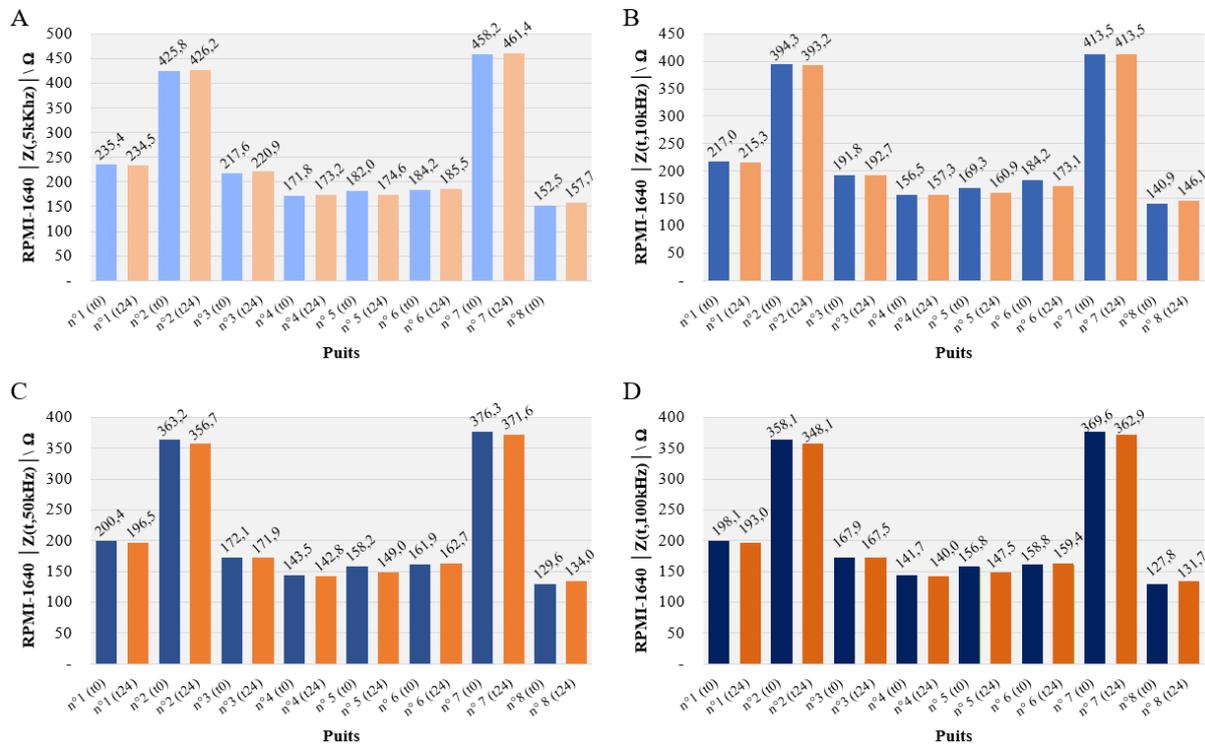


Figure 48 : Représentation des valeurs d'impédance du milieu de culture dans le dispositif 10 puits aux temps 1 h et 24 h post-acquisition aux fréquences (A) 5kHz ; (B) 10kHz ; (C) 50kHz et (D) 100kHz.

	Valeur d'impédance moyenne (Ohm)							
	Puits 1	Puits 2	Puits 3	Puits 4	Puits 5	Puits 6	Puits 7	Puits 8
5 kHz	235	426	219,2	172,5	178,3	184,9	459,8	155,1
10 kHz	216,1	393,7	192,2	156,9	165,1	178,7	413,5	143,5
50 kHz	198,5	360	172	143,1	153,6	162,3	373,9	131,8
100 kHz	195,5	353,1	167,7	140,8	152,1	159,1	366,3	129,8

Tableau 7 : Comparaison des valeurs d'impédance moyennes du milieu de culture RPMI-1640 en fonction des fréquences après 24 h d'acquisition.

4.3 Croissances cellulaires dans le dispositif 10 puits

L'obtention des dix puits nous a permis de tester deux lignées cellulaires en parallèle. Ainsi, la croissance des cellules HCT-8 a été comparée à la croissance des cellules COLO-680N (*Figure 49*). Une distinction entre les deux profils d'impédance a pu être observée.

En effet, comme présentés dans les *Figures 49A et 49C*, entre 500 Hz et 5 kHz, les cellules COLO-680N présentent une réponse impédimétrique très stable dans le temps puisque les courbes obtenues à 1h et 24 h se superposent. Pour leur part, les cellules HCT-8 présentent sur la même gamme de fréquences

des différences de réponse impédimétrique. En revanche l'amplitude de l'impédance lors de la croissance des COLO-680N varie légèrement dans le temps aux fréquences comprises entre 5 kHz et 100 kHz. Dans la même gamme de fréquences, les HCT-8 présentent des valeurs d'impédance particulièrement stables dans le temps. Les observations microscopiques ont permis de mettre en évidence des différences morphologiques entre les deux lignées où les cellules COLO-680N formaient des projections cytoplasmiques alors que les HCT-8 formaient un tapis cellulaire plus compact (*Figures 49B et 49D*) celui-ci couvrant efficacement la surface des électrodes provoquant une augmentation de l'impédance contrairement au cas des COLO-680N.

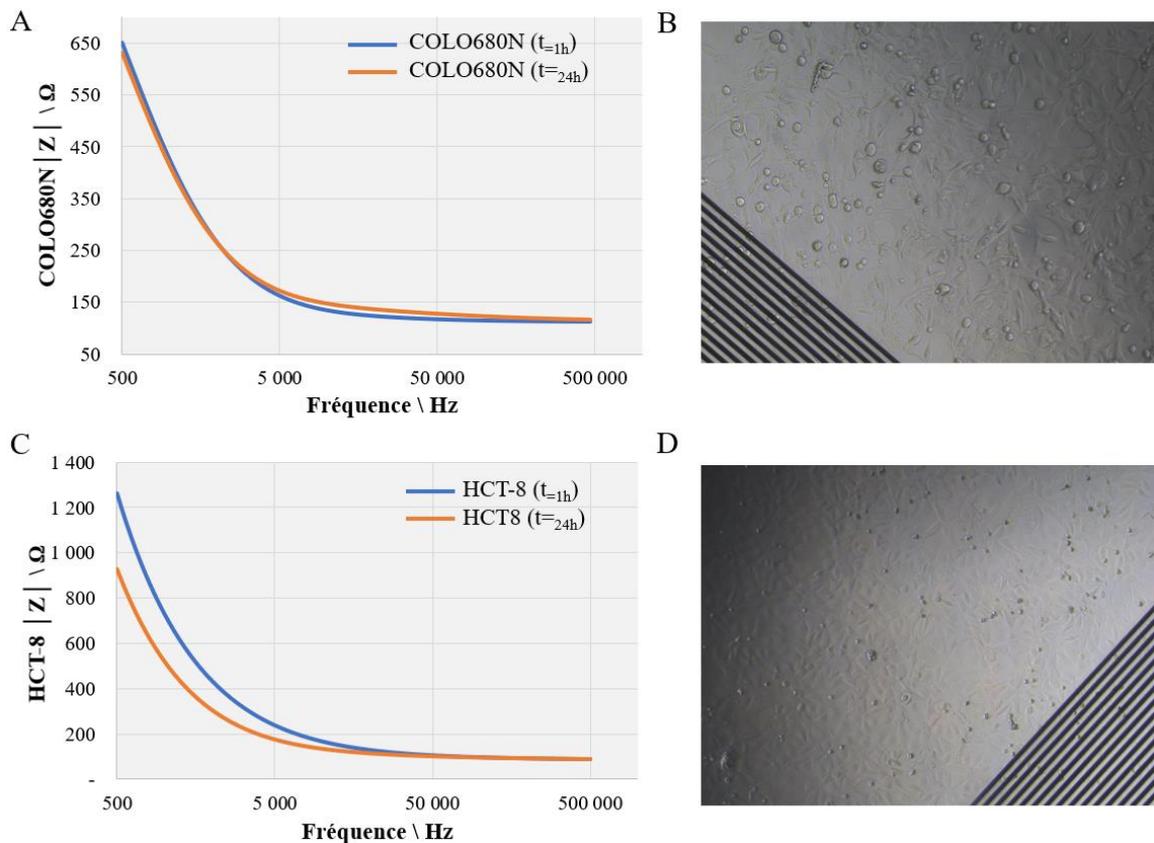


Figure 49 : Croissance des cellules COLO680N et HCT-8. (A) Spectre d'impédance des cellules COLO680N aux temps 1h et 24h post-ensemencement ; (B) Observation microscopique des cellules COLO680N à 24h de croissance (Gx400). (C) Spectres d'impédance des cellules HCT-8 aux temps 1h et 24h post-ensemencement. (D) Observation microscopique des cellules HCT-8 à 24h de croissance (Gx400). Les barres en noir représentent les électrodes interdigitées.

La *Figure 50* souligne également les différentes réponses impédimétriques normalisées des croissances cellulaires en fonction de fréquence. Dans le cas des cellules HCT-8, l'amplitude augmente très rapidement au cours des deux premières heures avant de diminuer brusquement aux fréquences inférieures à 50 kHz. En ce qui concerne les cellules COLO-680N, à l'exception de la fréquence 1 kHz dont l'amplitude diminue, on peut remarquer que l'augmentation de l'amplitude est plus progressive par rapport aux cellules HCT-8.

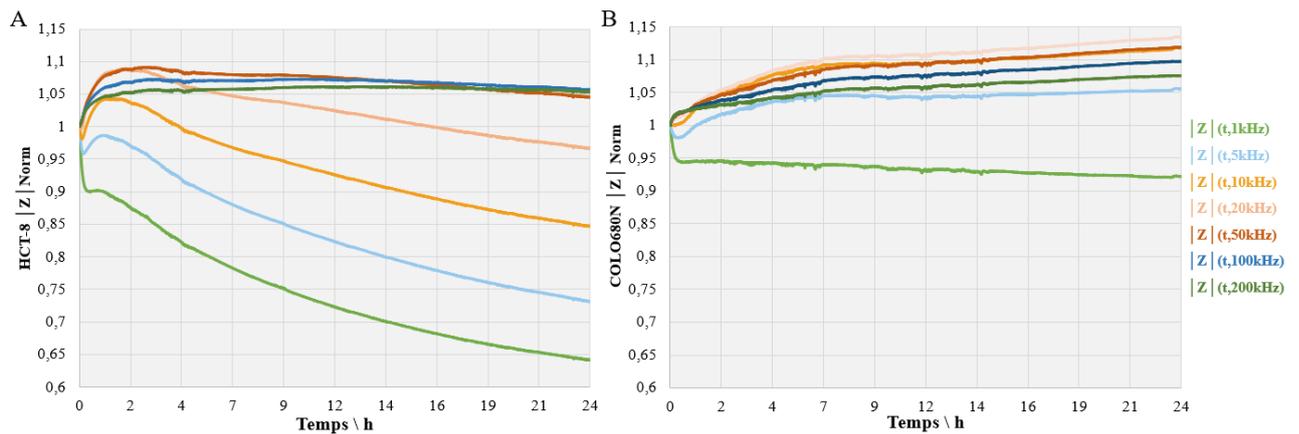


Figure 50 : Réponses impédimétriques normalisées de la croissance cellulaire des cellules HCT-8 (A) et des cellules COLO680N (B) durant 24 heures à différentes fréquences de 1 kHz à 200 kHz.

4.4 Suivi par impédance de l'infection des cellules HCT-8 par *C. parvum*

Les cellules HCT-8 ont étéensemencées dans le dispositif 10 puits (Figure 51) jusqu'à confluence et infectées avec des oocystes de *C. parvum*. Après trente minutes de stabilisation dans l'étuve 37°C, la réponse impédimétrique a été enregistrée durant 24 heures. En comparant avec les résultats obtenus précédemment avec le prototype ne contenant qu'un seul puits, le signal du milieu reste bien constant au cours de l'expérimentation. On peut également observer une baisse de l'amplitude pour les cellules non infectées rappelant le profil obtenu avec les cellules infectées avec le parasite inactivé. En revanche, les puits infectés avec *C. parvum* présentent une légère augmentation de l'impédance entre les temps 9 et 13 heures post-infection qui est équivalente à celle obtenue dans le modèle ne comportant qu'un seul puits. Il est à noter toutefois que l'amplitude de la réponse impédimétrique reste relativement faible. Ce constat souligne un manque de sensibilité du système. Cette faiblesse dans le niveau de détection des cellules infectées pourrait être problématique si les variations de réponses cellulaires lors des tests de nouveaux traitements s'avéraient également faibles. En effet, il pourrait être à craindre que le dispositif ainsi élaboré ne soit pas en mesure de détecter ces faibles variations liées au traitement.

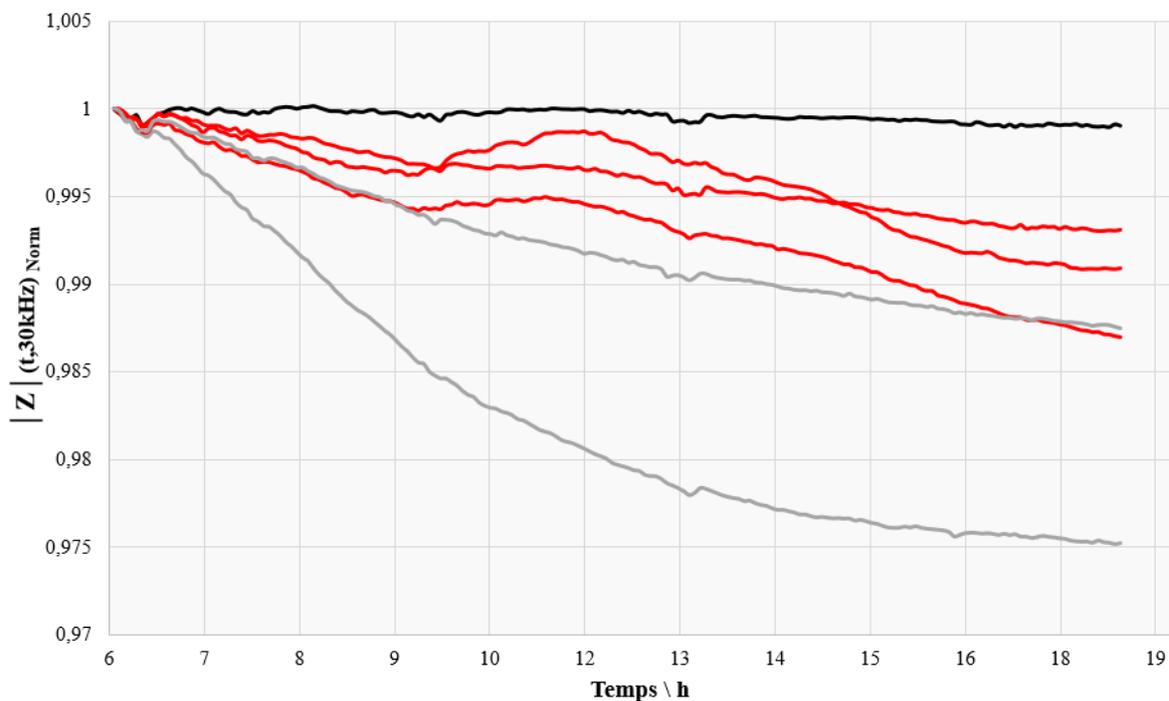


Figure 51 : Réponses impédimétriques normalisées des cellules HCT-8 infectées pendant 24 h par *C. parvum* (Iowa) (courbes rouge); les cellules non infectées (gris) et le milieu de culture RPMI-1640 (noir).

Or les travaux de *Dibao-Dina (2015)* ont permis d'obtenir un suivi de l'infection des cellules HCT-8 par *C. parvum* pendant 60 heures en utilisant des électrodes interdigitées. Trois pics reproductibles avaient été mis en évidence aux temps 12 h – 23 h et 31 h post-infection ainsi que trois minima aux temps 9 h -19 h et 28 h post-infection. Ces pics et ses minima ont pu être corrélés à l'alternance des formes libres (zoïtes) et intracellulaires du parasite. Dans notre cas, l'utilisation des électrodes commerciales interdigitées *Metrohm* n'a pas permis d'obtenir ce niveau de précision permettant de discriminer les étapes de développement du parasite *C. parvum*. Toutefois, une réponse impédimétrique spécifique des cellules HCT-8 infectées a pu être mise en évidence par rapport aux réponses des cellules non infectées ou infectées avec des oocystes inactivés. D'ailleurs, l'augmentation de l'impédance retrouvé au temps 11 h post-infection est concordant avec les résultats obtenus par *Alfred Dibao-Dina*. Néanmoins, l'absence des autres profils caractéristiques du signal décrit par *Dibao-Dina* pourrait venir des types d'électrode différant par leur composition (Platine vs or) ainsi que par leur géométrie. En effet, les électrodes utilisées par *Dibao-Dina* sont composées de disques déposés les uns à côté des autres, permettant de sonder le tapis cellulaire dans de multiples directions, contrairement aux électrodes commerciales *Methrohm* rectilignes.

Ainsi, le manque de sensibilité des électrodes interdigitées commerciales *Methrohm* nous pousse à utiliser des électrodes fabriquées selon le *design* et les dimensions d'électrodes précédemment décrits dans les travaux de *Dibao-Dina* afin de mettre au point le dispositif 96 puits destiné au criblage de molécules à visée thérapeutique.

Perspectives

1. Stratégies à court terme : amélioration des techniques

Pour corréler les mesures électriques aux informations obtenues par microscopie, deux techniques d'imagerie peuvent être utilisées : l'imagerie à fond clair (*Bright-field*) et à fluorescence (*Figure 52*). L'avantage de la fluorescence est qu'elle permet d'obtenir un marquage ciblé du parasite mais l'immunomarquage s'effectue sur des cellules « fixées » empêchant le suivi en temps réel de l'infection. De même, une exposition prolongée entraîne une perte du signal fluorescent (*photoblanchiment*). A l'inverse, l'imagerie à fond clair (*bright-field*) est une méthode non invasive qui ne nécessite pas de préparation ni de coloration particulière. Elle est adaptée à l'observation directe des cellules vivantes dans leur milieu de culture. Néanmoins, l'interprétation des résultats est extrêmement compliquée, favorisant ainsi l'utilisation de la fluorescence. Bien que les images fluorescentes facilitent l'analyse des résultats, la reconnaissance des différents stades de développement du parasite *C. parvum* demeure complexe même pour des spécialistes du domaine.

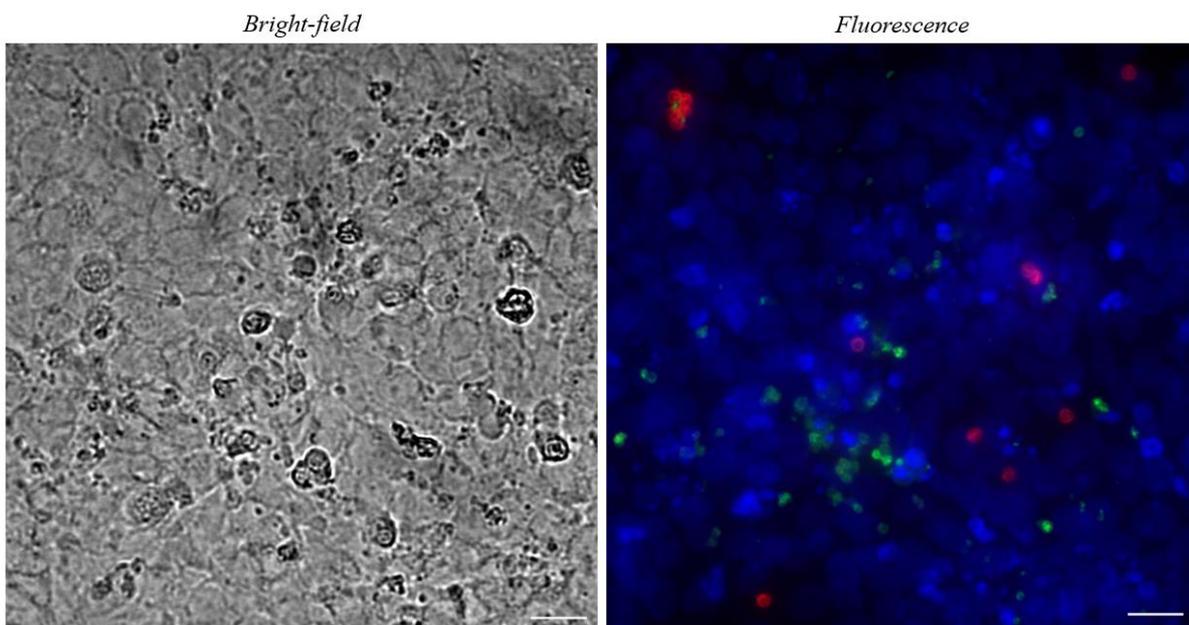


Figure 52 : Comparaison des méthodes d'imagerie à fond clair (*Bright-field*) et à fluorescence pour la visualisation des cellules infectées par *C. parvum* (Gx630 ; barre d'échelle 20 μ m).

La détection des différentes formes du parasite est d'autant plus importante dans le criblage de molécules présentant une activité anti-*Cryptosporidium* qu'elle permettrait d'aborder la compréhension du mécanisme d'action à l'origine de l'inhibition. En effet, de nombreux inhibiteurs ont été mis en évidence sans pour autant connaître leur(s) cible(s) spécifique(s) ou le moment du cycle de vie du parasite pour lequel ils sont les plus efficaces. Dans ce contexte, l'amélioration du système de détection automatisé *StarDist* semble intéressant pour identifier la phase du cycle où la molécule est la plus active.

1.1 Amélioration du système de détection automatisé des images microscopiques

L'entraînement du plugin *StarDist* pourra être effectué en utilisant une cinquantaine d'images issues des précédentes expériences d'infection. Cet entraînement permettra non seulement d'affiner la capacité du logiciel à identifier et isoler les formes parasitaires, mais aussi à définir sa capacité de détection en fonction des temps d'infection : 24 h, 48 h et 72 h.

Les travaux d'analyse ont permis d'identifier des classes de tailles du parasite. Il est maintenant essentiel de définir si ces classes peuvent être attribuées à des formes spécifiques prises par le parasite lors de son développement. Des anticorps spécifiques de chaque stade du cycle de vie de *C. parvum* ont été mis au point dans le laboratoire du Pr. Sibley (*Washington University in St. Louis*) (*Wilke et al., 2018 ; 2019*). L'utilisation de ces anticorps va permettre de caractériser les différents stades (temps d'apparition et aspect morphologique) et d'obtenir des données morphométriques plus précises pour les discriminer. Cela nous permettra également de développer un modèle de reconnaissance automatisé des formes du parasite par *StarDist* et par une approche basée sur une *Intelligence Artificielle* développée par nos collaborateurs (*Yang et al., 2022*) et dont les premiers résultats ont été présentés lors de la conférence internationale *MICCAI 2022 (Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention)*.

1.2 Conception d'un dispositif 96 puits destiné au criblage de molécules

Le développement d'un dispositif standard 96 puits (en cours de fabrication) permettra de répondre aux normes de criblage de molécules thérapeutiques. En s'appuyant sur les travaux de *Dibao-Dina*, des électrodes interdigitées transparentes en or de forme arrondies (*Figure 53*) vont être utilisées.

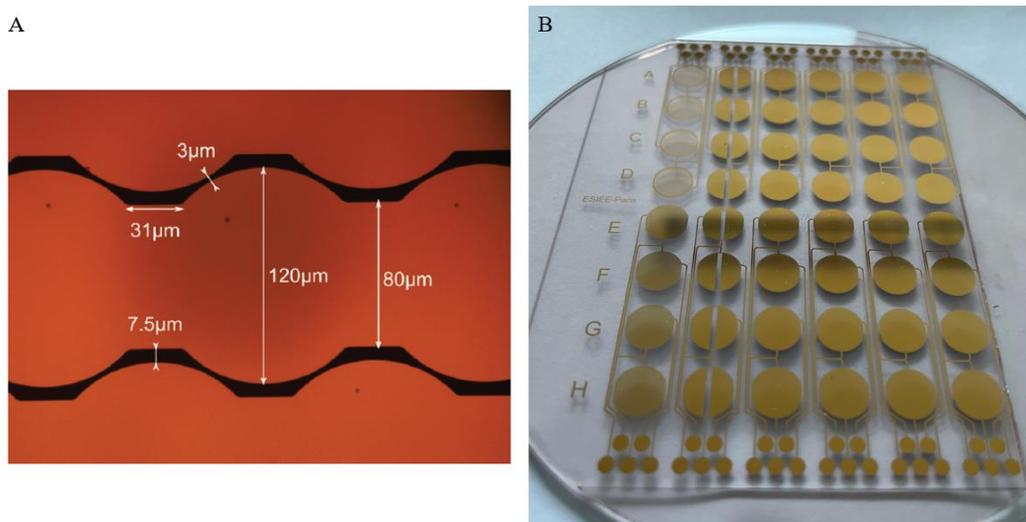


Figure 53 : (A) Paramètres géométriques des électrodes interdigitées (Thèse Alfred Dibao-Dina, 2015) (B) Plaquette 48 puits destinée à la conception du dispositif 96 puits.

Ce dispositif permettra dans un premier temps, de visualiser la réponse électrique des cellules infectées par *C. parvum* avec et sans traitement à la paromomycine. L'utilisation de ces formes d'électrodes

devraient permettre d'augmenter la sensibilité du dispositif à la détection de l'infection parasitaire. De plus, la gamme de dilution de paromomycine permettra de définir les valeurs de CI_{50} de plus rapidement et de manière automatisée. Actuellement la mesure de cette CI_{50} par approche moléculaire requiert en plus de la phase d'infestation sur 48 h à 72 h, une phase d'extraction/purification d'ADN et une phase d'amplification par qPCR qui peut prendre 48 h. La caractérisation de cette CI_{50} par des approches en microscopie de fluorescence peut prendre, quant à elle, plus de 72 h entre le traitement des lames pour fixer et immunomarquer les cellules infectées, réaliser la capture des images et effectuer le traitement de ces dernières afin de quantifier le développement parasitaire et pour finalement déterminer l'inhibition de la paromomycine.

L'évaluation de ces temps d'analyses post infestation reste relative car avec l'augmentation du nombre de points de prélèvements (T0, T6h, T12h, T24h, T36h *etc.*) ou du nombre de points de la gamme de dilution réalisée à minima en triplicata, le temps d'obtention et de traitement des données peut être démultiplié. La capacité de quantifier sur des images de microscopie de manière automatisée la charge parasitaire présente sur les lames est déjà un point d'amélioration et d'acquisition plus rapide des résultats. Mais c'est bien par l'usage et le développement de méthodes non invasives telles que la spectroscopie d'impédance, que les résultats pourront être donnés très rapidement (premiers signes électriques caractéristique d'une réponse du tapis cellulaire à l'infection dès 10 hpi). De même, cette approche électrique devrait permettre d'identifier le(s) moment(s) d'action de la paromomycine (et par la suite des molécules à visée thérapeutiques) en permettant une mesure continue du tapis cellulaire sans l'altérer. L'objectif sera de retrouver un profil impédimétrique similaire à celui des témoins obtenus avec des parasites inactivés.

2. Stratégies à moyen terme

2.1 Aspects biologiques liés à *C. parvum*

Après validation du dispositif, un criblage de molécules pourra être réalisé en vérifiant tout d'abord la cytotoxicité des molécules d'intérêts, puis en déterminant leur efficacité contre *C. parvum* à différents niveaux : sur l'invasion cellulaire et sur les stades de croissance du parasite. En ce qui concerne les molécules testées, une banque de molécules de nos partenaires pourra être utilisée (UKC) et plusieurs contacts avec les entreprises *EW Nutrition* et *Photosynthese (laboratoire Lehning)* ont déjà été entrepris.

Dans un second temps, différentes espèces de *Cryptosporidium* (*C. parvum* et *C. hominis*) seront caractérisées afin de déterminer s'il existe une signature électrique entre ces espèces qui permettrait de les différencier. Ce travail sera également réalisé avec différentes souches de *C. parvum* puisqu'à ce jour, aucune méthode autre que le séquençage génétique ne permet de différencier différents types de souches.

Enfin, une souche mutante de *C. parvum* résistante aux médicaments (*CpMut*) sera investiguée. En effet, l'équipe de *Christopher Huston* (Conférence *ApicoWplexa* 2022, Berne) a récemment mis au point la souche *CpMut* dans le but d'identifier les cibles de molécules thérapeutiques et d'étudier le phénomène de résistance du parasite. Leur étude a permis de montrer qu'une résistance au composé MMV665917 a rapidement été atteinte en seulement quatre doses chez des souris infectées par la souche *CpMut*. Ainsi, l'utilisation de cette souche permettrait d'identifier précocement les phénomènes de résistance dans la recherche de molécules anticryptosporidies ainsi que les mutations impliquées dans la résistance.

2.2 Aspects techniques : amélioration du dispositif 96 puits

2.2.1 Conception d'électrodes interdigitées transparentes

Pour faciliter l'interprétation des réponses électriques en visualisant l'état des cellules en temps réel, la conception d'électrodes transparentes sera envisagée en utilisant comme matériau l'ITO (*Indium Tin Oxide*). En effet, ce type d'électrode ITO a permis de déterminer l'efficacité de molécules antifibrotiques sur des cellules humaines primaires de patients et l'utilisation de la microscopie à fluorescence a permis de visualiser à quel moment la molécule était la plus efficace. (*Parviz et al., 2017*). Cette approche semble donc intéressante puisque la microscopie permet à la fois de confirmer les résultats impédimétriques mais également d'évaluer quantitativement l'efficacité des molécules testées. Toutefois, ce matériau reste bien moins utilisé que l'or qui est considéré comme le matériau standard dans la fabrication des électrodes en raison d'une sensibilité supérieure à celle de l'ITO. Une étude réalisée par *Martinez et ses collaborateurs (2017)* a permis d'augmenter la sensibilité des électrodes ITO sans affecter la transparence des électrodes en les recouvrant d'oxide d'iridium (*IrOx*). En effet, après comparaison des niveaux de sensibilité d'électrodes interdigitées composées de trois matériaux différents (Or, ITO et ITO recouvertes d'*IrOx*), les électrodes ITO modifiées ont été les plus sensibles pour étudier la croissance de cellules cancéreuses du sein (MCF-7) (*Figure 54*).

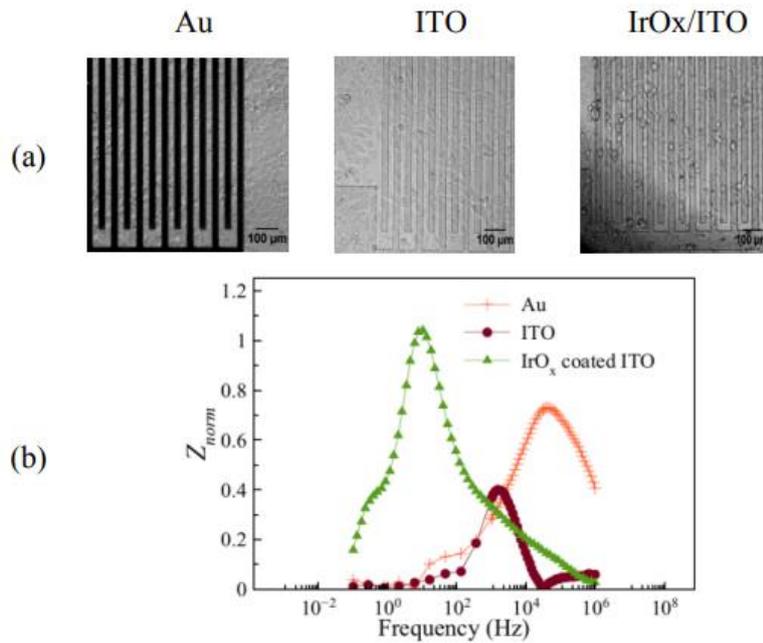


Figure 54 : Croissance des cellules MCF-7 (a) électrodes interdigitées en or (Au) ; ITO et ITO recouvertes d'IrOx. (b) Impédance normalisée après 43 h de croissance en fonction de la fréquence.

Ainsi, la transparence des électrodes permettra de suivre en parallèle l'infection des cellules par *C. parvum* en microscopie et d'identifier le stade du parasite ciblé lors des tests de molécules à visée thérapeutique.

3. Stratégies à long terme : rendre le modèle *in vitro* le plus proche de l'environnement rencontré *in vivo*

Amélioration de l'environnement *in vitro* de *C. parvum*

Les approches basées sur les microsystèmes sont de plus en plus utilisées dans le but de recréer les environnements *in vivo* et ainsi mimer les conditions réelles afin d'étudier les relations hôte-parasite pour comprendre les mécanismes de la pathogénèse. Dans le cas de *Cryptosporidium*, ces conditions doivent se rapprocher de celles retrouvées au niveau de l'intestin.

3.1 Développer une interface Air-Liquide (système ALI)

Wilke et ses collègues (2019) ont cultivé des cellules sur une membrane (système Transwells) et retiré le milieu de la chambre supérieur pour obtenir une partie apicale en contact de l'air et une partie basale immergée et ainsi former une interface air-liquide (Wang et al., 2015). Cette interface a été utilisée pour cultiver des sphéroïdes dérivés de cellules souches afin d'obtenir un environnement adapté au développement à long terme de *C. parvum* en modèle *in vitro* (Figure 55). Les auteurs ont démontré que le système ALI favorisait la croissance du parasite avec une amplification 100 fois supérieure au 20^e jour de culture par rapport à l'infection initiale. De même, la viabilité des cellules était plus importante dans

ce système et la prolifération des cellules souches ainsi que leur différenciation a permis d'obtenir un épithélium similaire à celui retrouvé dans l'intestin.

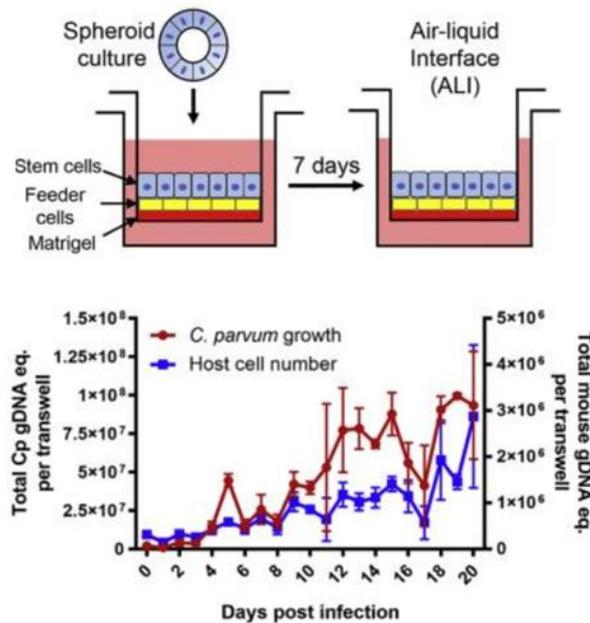


Figure 55 : Interface Aire-Liquide (ALI). Quantification de la croissance de *C. parvum* par qPCR dans le système ALI (Wilke et al., 2019).

Des changements métaboliques importants ont été remarqués par rapport aux cultures cellulaires traditionnelles entièrement immergées. Ce système a également permis d'obtenir une production d'oocystes infectieux et de générer des parasites transgéniques qui ont ensuite été amplifiés chez la souris.

3.2 Approche microfluidique

Dans ce contexte, Nikolaev et ses collègues (2020) ont utilisé des cellules souches intestinales pour former des « tubes épithéliaux » dont la disposition des cellules était similaire à celle des conditions *in vivo* avec la formation de villosités et de cryptes intestinales. Un système de pompe a permis de perfuser ces structures tubulaires afin d'obtenir un renouvellement du milieu et de prolonger l'espérance de vie des cellules (Figure 56). La prolifération, la différenciation et la régénération des cellules souches ont été obtenues dans ce système microfluidique. De même, une importante diversité cellulaire a pu être observée marquée par la présence d'entérocytes, de cellules caliciformes, de cellules de Paneth, de cellules entéroendocrines et même des cellules immunitaires (cellules M).

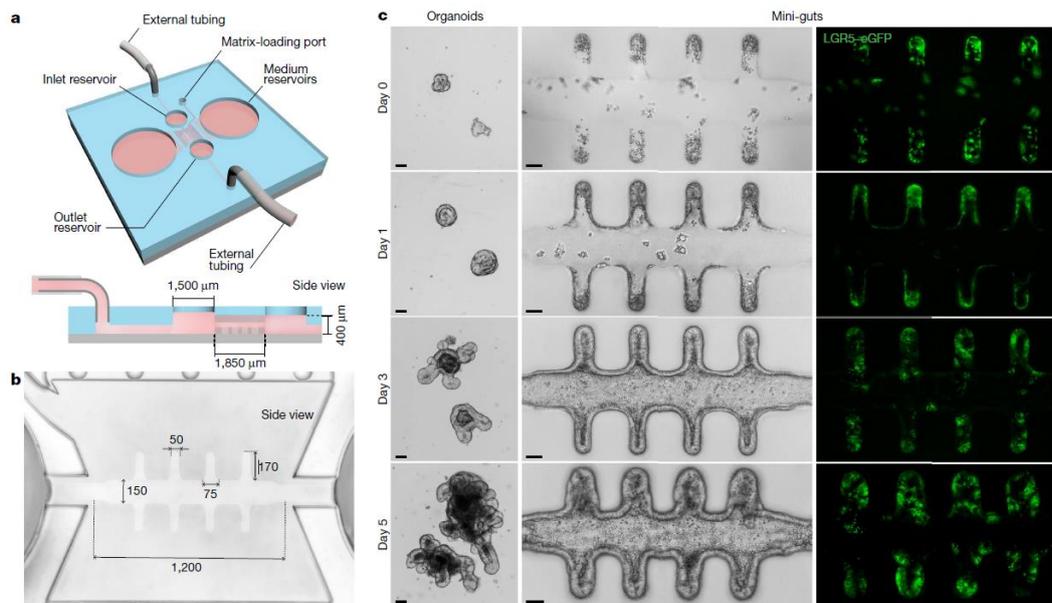


Figure 56 : (a) schéma du microdispositif composé d'une chambre d'hydrogel, de deux réservoirs latéraux destinés au milieu de culture de milieu ainsi qu'un réservoir d'entrée et de sortie pour la perfusion du milieu à travers les tubes formés de cellules. (b) dimensions en μm d'un microcanal. (c) Formation de l'épithélium en fonction du temps visualisée en fond clair (bright-field) (milieu) et en fluorescence en utilisant le marqueur de cellules souches LGR5-eGFP (droite) comparée à la formation d'organoïdes traditionnels (gauche) (Nikolaev et al., 2020).

Ces conditions optimales ont permis de cultiver le parasite *C. parvum* pendant 4 semaines et de visualiser le cycle complet du parasite ainsi que la formation d'oocystes. En effet, les auteurs ont observé la présence des mérontes (24-72 heures), des stades sexués Microgamontes et Macrogamontes (72-96 heures) ainsi que la formation d'oocystes après 120 heures d'infection (Figure 57).

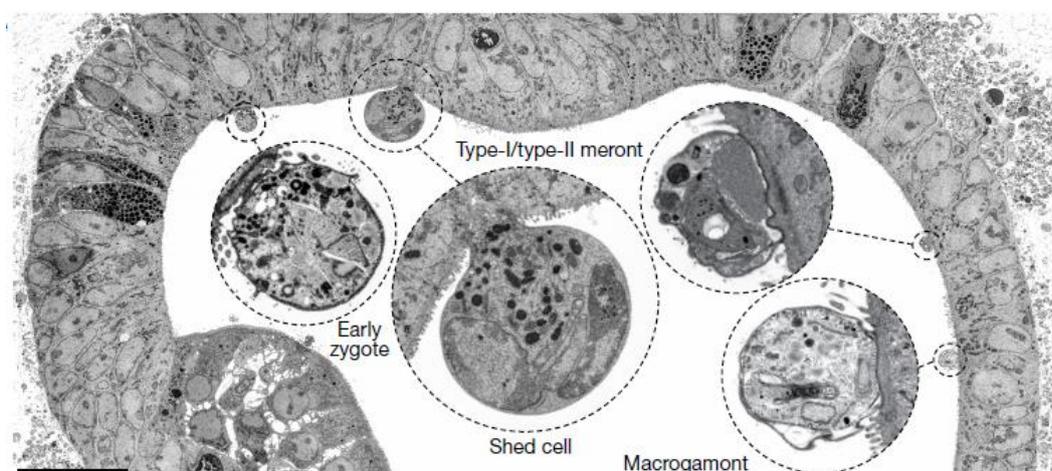


Figure 57 : Visualisation des différents stades de *C. parvum* après 72 heures d'infection (SEM, barre d'échelle 25 μm) (Nikolaev et al., 2020).

De même, il serait intéressant d'améliorer l'approche microfluidique en ajoutant un gradient d'oxygénation (*Jalili-Firoozinezhad et al., 2019*). En effet, en condition *in vivo* les cellules épithéliales de l'intestin sont exposées à de faibles concentrations en oxygène (1 à 11% d'O₂) alors que les méthodes conventionnelles de culture effectuées en laboratoires sont réalisées en condition hyperoxique (21% d'O₂). Les changements métaboliques observés par *Wilke et ses collègues (2019)* en utilisant l'interface ALI souligne l'importance de recréer les conditions *in vivo*.

Utilisation du dispositif sur d'autres pathogènes

D'autres agents pathogènes comme les virus pourront être caractérisés dans le but de distinguer les différents niveaux de virulence entre les souches virales ainsi que le risque infectieux de ces souches. La récente épidémie du SRAS-CoV-2 (*Severe acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) ainsi que la réémergence de certains virus (Zika, Ebola, variole du singe) ont mis en évidence la menace importante que représentent ces virus au niveau mondial. Les méthodes standards d'identification de nouveaux composés antiviraux ou d'évaluation du pouvoir infectieux des virus, se basent sur des tests quantifiant les effets cytopathiques (CPE) des cellules hôtes après l'infection virale. Ces approches visent à déterminer la dose infectieuse pour laquelle 50% des cellules sont infectées (CC ID₅₀, *50% Cell Culture Infection Dose*) en s'intéressant à la viabilité cellulaire en utilisant des tests colorimétriques ou en quantifiant la réplication virale par microscopie ou par des méthodes moléculaires. Plusieurs études menées sur différents virus tels que le virus de la grippe A (*McCoy et Wang, 2005 ; Campbell et al., 2007*) ; le virus de la dengue (*Cheng et al., 2015*) ; le virus du Chikungunya (*Zandi, 2016*) ; des virus de l'herpès (*Pennington et Walle, 2017 ; Thieulent et al., 2019*) ou encore le virus Zika (*Oeyen et al., 2022*) ont permis de mettre en évidence les avantages de l'approche ECIS pour confirmer, voire remplacer les tests CC ID₅₀ traditionnels laborieux et coûteux. En effet, *Cheng et ses collaborateurs (2015)* ont été les premiers à caractériser différentes souches du virus de la dengue à partir d'échantillons cliniques en moins de 30 h alors que les techniques standards (Microscopie et PCR) nécessitaient 72 h pour parvenir au même résultat. De même, l'efficacité de molécules antivirales contre le virus Zika a pu être déterminée par ECIS avec une activité antivirale dépendante du temps de traitement (*Oeyen et al., 2022*). Les auteurs ont pu remarquer la présence d'une diminution de l'efficacité des traitements en fonction du temps alors que cette observation n'aurait pas pu être visualisée par des techniques traditionnelles réalisées à un temps fixe. De plus, les auteurs ont montré que l'efficacité des traitements pouvait dépendre de la dose infectieuse puisqu'une inhibition complète a pu être observée lors d'une faible dose infectieuse (*MOI de 0,01*) alors que pour une dose plus élevée, l'effet cytopathique a simplement été retardé. Ce constat est d'autant plus important puisque la majorité des tests antiviraux évalue l'efficacité des molécules thérapeutiques à une seule dose infectieuse (*Oeyen et al., 2022*). Ces données encouragent donc l'utilisation de la spectroscopie d'impédance pour caractériser les différents niveaux d'infectiosité et de virulence de diverses espèces (ou de souches) de virus. De même, l'étude réalisée par *Thieulent et son équipe (2019)* a permis de mettre en avant le potentiel de criblage de

molécules à visée thérapeutiques en utilisant le système commercial d'électrodes interdigitées au format 96 puits « xCELLigence » (RTCA, Agilent). Les auteurs ont ainsi pu tester 80 composés contre le virus EHV-1 (*Equid alpha-herpesviruse-1*) conduisant à la découverte de la spironolactone en tant que nouvel inhibiteur. Ainsi, le criblage de chimiothèques par le dispositif 96 puits pourra être envisagé afin de mettre en évidence des molécules présentant une activité antivirale, ou encore, tester des anticorps dirigés contre des virus comme cela a pu être réalisé par *Zost et al.,2020*, qui ont isolé des anticorps dirigés contre la protéine *Spike* du virus *SARS-CoV-2*.

Bibliographie

A

- Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S, Abrahante JE, Zhu G, Lancto CA, Deng M, Liu C, Widmer G, Tzipori S, Buck GA, Xu P, Bankier AT, Dear PH, Konfortov BA, Spriggs HF, Iyer L, Anantharaman V, Aravind L, Kapur V. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*. 2004 Apr 16;304(5669):441-5. doi: 10.1126/science.1094786. Epub 2004 Mar 25. PMID: 15044751.
- Abubakar I, Aliyu SH, Arumugam C, Usman NK, Hunter PR. Treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised individuals: systematic review and meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol*. 2007 Apr;63(4):387-93. doi: 10.1111/j.1365-2125.2007.02873.x. Epub 2007 Mar 1. PMID: 17335543; PMCID: PMC2203234.
- Adell AD, Miller WA, Harvey DJ, Vanwormer E, Wuertz S, Conrad PA. Individual subject meta-analysis of parameters for *Cryptosporidium parvum* shedding and diarrhoea in animal experimental models. *Epidemiol Infect*. 2013 Aug;141(8):1662-78. doi: 10.1017/S0950268812002294. Epub 2012 Oct 16. PMID: 23068915; PMCID: PMC9151584.
- Alak JI, Wolf BW, Mdurvwa EG, Pimentel-Smith GE, Kolavala S, Abdelrahman H, Suppiramaniam V. Supplementation with *Lactobacillus reuteri* or *L. acidophilus* reduced intestinal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in immunodeficient C57BL/6 mice. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1999 Sep;45(6):855-63. PMID: 10541481.
- Amadi B, Mwiya M, Musuku J, Watuka A, Sianongo S, Ayoub A, Kelly P. Effect of nitazoxanide on morbidity and mortality in Zambian children with cryptosporidiosis: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002 Nov 2;360(9343):1375-80. doi: 10.1016/S0140-6736(02)11401-2. PMID: 12423984.
- Amadi B, Mwiya M, Sianongo S, Payne L, Watuka A, Katubulushi M, Kelly P. High dose prolonged treatment with nitazoxanide is not effective for cryptosporidiosis in HIV positive Zambian children: a randomised controlled trial. *BMC Infect Dis*. 2009 Dec 2;9:195. doi: 10.1186/1471-2334-9-195. PMID: 19954529; PMCID: PMC2794874.
- An Y, Jin T, Zhang F, He P. Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) for profiling cytotoxicity of cigarette smoke. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. (834) :180-186
- Anchan A, Kalogirou-Baldwin P, Johnson R, Kho DT, Joseph W, Hucklesby J, Finlay GJ, O'Carroll SJ, Angel CE, Graham ES. Real-Time Measurement of Melanoma Cell-Mediated Human Brain Endothelial Barrier Disruption Using Electric Cell-Substrate

Impedance Sensing Technology. *Biosensors (Basel)*. 2019 Apr 15;9(2):56. doi: 10.3390/bios9020056. PMID: 30991758; PMCID: PMC6627833.

Arrowood MJ. *In vitro* cultivation of *Cryptosporidium* species. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Jul;15(3):390-400. doi: 10.1128/CMR.15.3.390-400.2002. PMID: 12097247; PMCID: PMC118076.

Asadpour M, Namazi F, Razavi SM, Nazifi S. Comparative efficacy of curcumin and paromomycin against *Cryptosporidium parvum* infection in a BALB/c model. *Vet Parasitol*. 2018 Jan 30;250:7-14. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.12.008. Epub 2017 Dec 9. PMID: 29329627.

Audebert C, Bonardi F, Caboche S, Guyot K, Touzet H, Merlin S, Gantois N, Creusy C, Meloni D, Mouray A, Viscogliosi E, Certad G, Benamrouz-Vanneste S, Chabé M. Genetic basis for virulence differences of various *Cryptosporidium parvum* carcinogenic isolates. *Sci Rep*. 2020 Apr 30;10(1):7316. doi: 10.1038/s41598-020-64370-0. PMID: 32355272; PMCID: PMC7193590.

B

Bagnaninchi PO, Drummond N. Real-time label-free monitoring of adipose-derived stem cell differentiation with electric cell-substrate impedance sensing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Apr 19;108(16):6462-7. doi: 10.1073/pnas.1018260108. Epub 2011 Apr 4. PMID: 21464296; PMCID: PMC3080969.

Baillou A, Kasal-Hoc N, Barc C, Cognié J, Pinard A, Pezant J, Schulthess J, Peltier-Pain P, Lacroix-Lamandé S, Laurent F. Establishment of a Newborn Lamb Gut-Loop Model to Evaluate New Methods of Enteric Disease Control and Reduce Experimental Animal Use. *Vet Sci*. 2021 Aug 24;8(9):170. doi: 10.3390/vetsci8090170. PMID: 34564564; PMCID: PMC8472880.

Baishanbo A, Gargala G, Duclos C, François A, Rossignol JF, Ballet JJ, Favennec L. Efficacy of nitazoxanide and paromomycin in biliary tract cryptosporidiosis in an immunosuppressed gerbil model. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Feb;57(2):353-5. doi: 10.1093/jac/dki456. Epub 2005 Dec 16. PMID: 16361328.

Baragaña B, Forte B, Choi R, Nakazawa Hewitt S, Bueren-Calabuig JA, Pisco JP, Peet C, Dranow DM, Robinson DA, Jansen C, Norcross NR, Vinayak S, Anderson M, Brooks CF, Cooper CA, Damerow S, Delves M, Dowers K, Duffy J, Edwards TE, Hallyburton I, Horst BG, Hulverson MA, Ferguson L, Jiménez-Díaz MB, Jumani RS, Lorimer DD, Love MS, Maher S, Matthews H, McNamara CW, Miller P, O'Neill S, Ojo KK, Osuna-Cabello M, Pinto E,

- Post J, Riley J, Rottmann M, Sanz LM, Scullion P, Sharma A, Shepherd SM, Shishikura Y, Simeons FRC, Stebbins EE, Stojanovski L, Straschil U, Tamaki FK, Tamjar J, Torrie LS, Vantaux A, Witkowski B, Wittlin S, Yogavel M, Zuccotto F, Angulo-Barturen I, Sinden R, Baum J, Gamo FJ, Mäser P, Kyle DE, Winzeler EA, Myler PJ, Wyatt PG, Floyd D, Matthews D, Sharma A, Striepen B, Huston CD, Gray DW, Fairlamb AH, Pisiakov AV, Walpole C, Read KD, Van Voorhis WC, Gilbert IH. Lysyl-tRNA synthetase as a drug target in malaria and cryptosporidiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Apr 2;116(14):7015-7020. doi: 10.1073/pnas.1814685116. Epub 2019 Mar 20. PMID: 30894487; PMCID: PMC6452685.**
- Beaudeau P, de Valk H, Vaillant V, Mannschott C, Tillier C, Mouly D, Ledrans M. Lessons learned from ten investigations of waterborne gastroenteritis outbreaks, France, 1998-2006. *J Water Health*. 2008 Dec;6(4):491-503. doi: 10.2166/wh.2008.051. PMID: 18401114.**
- Benamrouz S, Conseil V, Chabé M, Praet M, Audebert C, Blervaque R, Guyot K, Gazzola S, Mouray A, Chassat T, Delaire B, Goetinck N, Gantois N, Osman M, Slomianny C, Dehennaut V, Lefebvre T, Viscogliosi E, Cuvelier C, Dei-Cas E, Creusy C, Certad G. *Cryptosporidium parvum*-induced ileo-caecal adenocarcinoma and Wnt signaling in a mouse model. *Dis Model Mech*. 2014 Jun;7(6):693-700. doi: 10.1242/dmm.013292. Epub 2014 Mar 20. PMID: 24652769; PMCID: PMC4036476.**
- Bessoff K, Sateriale A, Lee KK, Huston CD. Drug repurposing screen reveals FDA-approved inhibitors of human HMG-CoA reductase and isoprenoid synthesis that block *Cryptosporidium parvum* growth. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Apr;57(4):1804-14. doi: 10.1128/AAC.02460-12. Epub 2013 Feb 4. PMID: 23380723; PMCID: PMC3623326.**
- Bissuel F, Cotte L, Rabodonirina M, Rougier P, Piens MA, Trepo C. Paromomycin: an effective treatment for cryptosporidial diarrhea in patients with AIDS. *Clin Infect Dis*. 1994 Mar;18(3):447-9. doi: 10.1093/clinids/18.3.447. PMID: 8011833.**
- Blagburn BL, Sundermann CA, Lindsay DS, Hall JE, Tidwell RR. Inhibition of *Cryptosporidium parvum* in neonatal Hsd:(ICR)BR Swiss mice by polyether ionophores and aromatic amidines. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991 Jul;35(7):1520-3. doi: 10.1128/AAC.35.7.1520. PMID: 1929322; PMCID: PMC245207.**
- Bone Relat RM, Winder PL, Bowden GD, Guzmán EA, Peterson TA, Pomponi SA, Roberts JC, Wright AE, O'Connor RM. High-Throughput Screening of a Marine Compound Library Identifies Anti-*Cryptosporidium* Activity of Leiodolide A. *Mar Drugs*. 2022 Mar 30;20(4):240. doi: 10.3390/md20040240. PMID: 35447913; PMCID: PMC9026894.**

Bouزيد M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clin Microbiol Rev.* 2013 Jan;26(1):115-34. doi: 10.1128/CMR.00076-12. PMID: 23297262; PMCID: PMC3553671.

Buckner FS, Ranade RM, Gillespie JR, Shibata S, Hulverson MA, Zhang Z, Huang W, Choi R, Verlinde CLMJ, Hol WGJ, Ochida A, Akao Y, Choy RKM, Van Voorhis WC, Arnold SLM, Jumani RS, Huston CD, Fan E. Optimization of Methionyl tRNA-Synthetase Inhibitors for Treatment of *Cryptosporidium* Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019 Mar 27;63(4):e02061-18. doi: 10.1128/AAC.02061-18. PMID: 30745384; PMCID: PMC6437504.

Bueno da Silva Abreu, Luanna Chácara Pires, Karina Rodrigues dos Santos, Carlos Syllas Monteiro Luz, Marcelo Richelly Alves de Oliveira, Severino Cavalcante de Sousa Júnio. Occurrence of *Cryptosporidium spp.* and its association with ponderal development and diarrhea episodes in nellore mixed breed cattle. *Acta Veterinaria Brasilica* (2019) 24-29.

C

Cabada MM, White AC Jr. Treatment of cryptosporidiosis: do we know what we think we know? *Curr Opin Infect Dis.* 2010 Oct;23(5):494-9. doi: 10.1097/QCO.0b013e32833de052. PMID: 20689422.

Cacciò SM, Chalmers RM. Human cryptosporidiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2016 Jun;22(6):471-80. doi: 10.1016/j.cmi.2016.04.021. Epub 2016 May 10. PMID: 27172805.

Cai X, Woods KM, Upton SJ, Zhu G. Application of quantitative real-time reverse transcription-PCR in assessing drug efficacy against the intracellular pathogen *Cryptosporidium parvum* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Nov;49(11):4437-42. doi: 10.1128/AAC.49.11.4437-4442.2005. PMID: 16251280; PMCID: PMC1280145.

Cama VA, Ross JM, Crawford S, Kawai V, Chavez-Valdez R, Vargas D, Vivar A, Ticona E, Navincopa M, Williamson J, Ortega Y, Gilman RH, Bern C, Xiao L. Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *J Infect Dis.* 2007 Sep 1;196(5):684-91. doi: 10.1086/519842. Epub 2007 Jul 13. PMID: 17674309.

Campbell CE, Laane MM, Haugarvoll E, Giaever I. Monitoring viral-induced cell death using electric cell-substrate impedance sensing. *Biosens Bioelectron.* 2007 Nov 30;23(4):536-42. doi: 10.1016/j.bios.2007.06.015. Epub 2007 Jul 22. PMID: 17826975.

Castellanos-Gonzalez A, Sparks H, Nava S, Huang W, Zhang Z, Rivas K, Hulverson MA, Barrett LK, Ojo KK, Fan E, Van Voorhis WC, White AC Jr. A Novel Calcium-Dependent Kinase

- Inhibitor, Bumped Kinase Inhibitor 1517, Cures Cryptosporidiosis in Immunosuppressed Mice.** *J Infect Dis.* 2016 Dec 15;214(12):1850-1855. doi: 10.1093/infdis/jiw481. Epub 2016 Oct 12. PMID: 27738055; PMCID: PMC5142094.
- Castro Hermida JA, Freire Santos F, Oteiza López AM, Vergara Castiblanco CA, Ares-Mazás ME. In vitro and in vivo efficacy of lasalocid for treatment of experimental cryptosporidiosis.** *Vet Parasitol.* 2000 Jul 4;90(4):265-70. doi: 10.1016/s0304-4017(00)00243-0. PMID: 10856813.
- Castro-Hermida JA, González-Losada Y, Freire-Santos F, González-Warleta M, Mezo-Menéndez M, Ares-Mazás E. Efficacy of beta-cyclodextrin against experimental cryptosporidiosis in neonatal lambs.** *J Parasitol.* 2002 Feb;88(1):185-7. doi: 10.1645/0022-3395(2002)088[0185:EOCAEC]2.0.CO;2. PMID: 12053962.
- Castro-Hermida JA, Pors I, Otero-Espinar F, Luzardo-Alvarez A, Ares-Mazás E, Chartier C. Efficacy of alpha-cyclodextrin against experimental cryptosporidiosis in neonatal goats.** *Vet Parasitol.* 2004 Feb 26;120(1-2):35-41. doi: 10.1016/j.vetpar.2003.12.012. PMID: 15019141.
- Castro-Hermida JA, García-Presedo I, González-Warleta M, Mezo M, Fenoy S, Rueda C, del Aguila C. Activity of an anti-inflammatory drug against cryptosporidiosis in neonatal lambs.** *Vet Parasitol.* 2008 Aug 17;155(3-4):308-13. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.05.012. Epub 2008 May 22. PMID: 18579312; PMCID: PMC7131681.
- Certad G, Ngouanesavanh T, Guyot K, Gantois N, Chassat T, Mouray A, Fleurisse L, Pinon A, Cailliez JC, Dei-Cas E, Creusy C. *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma.** *Infect Agent Cancer.* 2007 Nov 21;2:22. doi: 10.1186/1750-9378-2-22. PMID: 18031572; PMCID: PMC2217515.
- Certad G, Viscogliosi E, Chabé M, Cacciò SM. Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*.** *Trends Parasitol.* 2017 Jul;33(7):561-576. doi: 10.1016/j.pt.2017.02.006. Epub 2017 Mar 20. PMID: 28336217.
- Chai JY, Guk SM, Han HK, Yun CK. Role of intraepithelial lymphocytes in mucosal immune responses of mice experimentally infected with *Cryptosporidium parvum*.** *J Parasitol.* 1999 Apr;85(2):234-9. PMID: 10219301.
- Chalmers RM. Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis.** *Ann Ist Super Sanita.* 2012;48(4):429-46. doi: 10.4415/ANN_12_04_10. PMID: 23247139.
- Chao AT, Lee BH, Wan KF, Selva J, Zou B, Gedeck P, Beer DJ, Diagana TT, Bonamy GMC, Manjunatha UH. Development of a Cytopathic Effect-Based Phenotypic Screening Assay**

against *Cryptosporidium*. *ACS Infect Dis*. 2018 Apr 13;4(4):635-645. doi: 10.1021/acsinfecdis.7b00247. Epub 2018 Jan 25. PMID: 29341586.

Chappell CL, Okhuysen PC, Langer-Curry R, Widmer G, Akiyoshi DE, Tanriverdi S, Tzipori S. *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 Nov;75(5):851-7. PMID: 17123976.

Chen XM, Keithly JS, Paya CV, LaRusso NF. Cryptosporidiosis. *N Engl J Med*. 2002 May 30;346(22):1723-31. doi: 10.1056/NEJMra013170. PMID: 12037153.

Chen XM, LaRusso NF. Mechanisms of attachment and internalization of *Cryptosporidium parvum* to biliary and intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2000 Feb;118(2):368-79. doi: 10.1016/s0016-5085(00)70219-8. PMID: 10648465.

Cheng MS, Lau SH, Chan KP, Toh CS, Chow VT. Impedimetric cell-based biosensor for real-time monitoring of cytopathic effects induced by dengue viruses. *Biosens Bioelectron*. 2015 Aug 15;70:74-80. doi: 10.1016/j.bios.2015.03.018. Epub 2015 Mar 10. PMID: 25794961; PMCID: PMC7126431.

Clezy K, Gold J, Blaze J, Jones P. Paromomycin for the treatment of cryptosporidial diarrhoea in AIDS patients. *AIDS*. 1991 Sep;5(9):1146-7. PMID: 1930784.

Costa D, Razakandrainibe R, Valot S, Vannier M, Sautour M, Basmaciyan L, Gargala G, Viller V, Lemeteil D, Ballet JJ; French National Network on Surveillance of Human Cryptosporidiosis; Dalle F, Favennec L. Epidemiology of Cryptosporidiosis in France from 2017 to 2019. *Microorganisms*. 2020 Sep 4;8(9):1358. doi: 10.3390/microorganisms8091358. PMID: 32899825; PMCID: PMC7563450.

Costa D, Razakandrainibe R, Basmaciyan L, Raibaut J, Delaunay P, Morio F, Gargala G, Villier V, Mouhajir A, Levy B, Rieder C, Larreche S, Lesthelle S, Coron N, Menu E, Demar M, Pommier de Santi V, Blanc V, Valot S, Dalle F and Favennec L. A summary of cryptosporidiosis outbreaks reported in France and overseas departments, 2017–2020. *Food Waterborne Parasitol*. 2022 Jun; 27: e00160. doi: 10.1016/j.fawpar.2022.e00160 PMCID: PMC9108463 PMID:35586547

D

Dalle F, Roz P, Dautin G, Di-Palma M, Kohli E, Sire-Bidault C, Fleischmann MG, Gallay A, Carbonel S, Bon F, Tillier C, Beaudeau P, Bonnin A. Molecular characterization of isolates of waterborne *Cryptosporidium spp.* collected during an outbreak of gastroenteritis in South Burgundy, France. *J Clin Microbiol*. 2003 Jun;41(6):2690-3. doi: 10.1128/JCM.41.6.2690-2693.2003. PMID: 12791906; PMCID: PMC156555.

- Darabus G, Olariu R.** The homologous and interspecies transmission of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium meleagridis*. *Pol J Vet Sci.* 2003;6(3):225-8. PMID: 14510055.
- De Graaf DC, Vanopdenbosch E, Ortega-Mora LM, Abbassi H, Peeters JE.** A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int J Parasitol.* 1999 Aug;29(8):1269-87. doi: 10.1016/s0020-7519(99)00076-4. PMID: 10576578; PMCID: PMC7127282.
- Del Coco VF, Córdoba MA, Sidoti A, Santín M, Drut R, Basualdo JA.** Experimental infection with *Cryptosporidium parvum* IIAA21G1R1 subtype in immunosuppressed mice. *Vet Parasitol.* 2012 Dec 21;190(3-4):411-7. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.06.033. Epub 2012 Jul 3. PMID: 22818787.
- 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.* 2015 Apr 15;66:69-76. doi: 10.1016/j.bios.2014.11.009. Epub 2014 Nov 10. PMID: 25460884.
- Dibao-Dina Alfred, 2015 (thèse).** Élaboration d'un système *in vitro* de suivi en continu par spectroscopie d'impédance électrique de l'infection d'une lignée cancéreuses par un protozoaire parasite : *Cryptosporidium parvum*. Université de Lille.
- Dinler Ay C, Voyvoda H, Ulutas PA, Karagenc T, Ulutas B.** Prophylactic and therapeutic efficacy of clinoptilolite against *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal lambs. *Vet Parasitol.* 2021 Nov;299:109574. doi: 10.1016/j.vetpar.2021.109574. Epub 2021 Sep 9. PMID: 34509876.
- Dong S, Yang Y, Wang Y, Yang D, Yang Y, Shi Y, Li C, Li L, Chen Y, Jiang Q, Zhou Y.** Prevalence of *Cryptosporidium* Infection in the Global Population: A Systematic Review and Meta-analysis. *Acta Parasitol.* 2020 Dec;65(4):882-889. doi: 10.2478/s11686-020-00230-1. Epub 2020 Jun 8. PMID: 32514837.
- Doumbo O, Rossignol JF, Pichard E, Traore HA, Dembele TM, Diakite M, Traore F, Diallo DA.** Nitazoxanide in the treatment of cryptosporidial diarrhea and other intestinal parasitic infections associated with acquired immunodeficiency syndrome in tropical Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 1997 Jun;56(6):637-9. doi: 10.4269/ajtmh.1997.56.637. PMID: 9230795.
- Downey AS, Chong CR, Graczyk TK, Sullivan DJ.** Efficacy of pyrvinium pamoate against *Cryptosporidium parvum* infection *in vitro* and in a neonatal mouse model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Sep;52(9):3106-12. doi: 10.1128/AAC.00207-08. Epub 2008 Jun 30. PMID: 18591280; PMCID: PMC2533469.

E

- Ehret R, Baumann W, Brischwein M, Schwinde A, Stegbauer K, Wolf B. Monitoring of cellular behaviour by impedance measurements on interdigitated electrode structures. *Biosens Bioelectron.* 1997;12(1):29-41. doi: 10.1016/0956-5663(96)89087-7. PMID: 8976050.**
- Eida AM, Eida MM, El-Desoky A. Pathological studies of different genotypes of human *Cryptosporidium* Egyptian isolates in experimentally mice. *J Egypt Soc Parasitol.* 2009 Dec;39(3):975-90. PMID: 20120760.**
- Eltahan R, Guo F, Zhang H, Xiang L, Zhu G. Discovery of ebselen as an inhibitor of *Cryptosporidium parvum* glucose-6-phosphate isomerase (CpGPI) by high-throughput screening of existing drugs. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2018 Apr;8(1):43-49. doi: 10.1016/j.ijpddr.2018.01.003. Epub 2018 Jan 30. PMID: 29414105; PMCID: PMC6114080.**
- Eltahan R, Guo F, Zhang H, Zhu G. The Action of the Hexokinase Inhibitor 2-deoxy-d-glucose on *Cryptosporidium parvum* and the Discovery of Activities against the Parasite Hexokinase from Marketed Drugs. *J Eukaryot Microbiol.* 2019 May;66(3):460-468. doi: 10.1111/jeu.12690. Epub 2018 Oct 5. PMID: 30222231; PMCID: PMC6421115.**
- English ED, Guérin A, Tandel J, Striepen B. Live imaging of the *Cryptosporidium parvum* life cycle reveals direct development of male and female gametes from type I meronts. *PLoS Biol.* 2022 Apr 18;20(4):e3001604. doi: 10.1371/journal.pbio.3001604. PMID: 35436284; PMCID: PMC9015140.**
- Ernest JA, Blagburn BL, Lindsay DS, Current WL. Infection dynamics of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporiidae) in neonatal mice (*Mus musculus*). *J Parasitol.* 1986 Oct;72(5):796-8. PMID: 3806334.**

F

- Fayer R, Guidry A, Blagburn BL. Immunotherapeutic efficacy of bovine colostrum immunoglobulins from a hyperimmunized cow against cryptosporidiosis in neonatal mice. *Infect Immun.* 1990 Sep;58(9):2962-5. doi: 10.1128/iai.58.9.2962-2965.1990. PMID: 2387630; PMCID: PMC313595.**
- Fayer R, Ellis W. Glycoside antibiotics alone and combined with tetracyclines for prophylaxis of experimental cryptosporidiosis in neonatal BALB/c mice. *J Parasitol.* 1993a Aug;79(4):553-8. PMID: 8392541.**
- Fayer R, Ellis W. Paromomycin is effective as prophylaxis for cryptosporidiosis in dairy calves. *J Parasitol.* 1993b Oct;79(5):771-4. PMID: 8410552.**

Finch GR, Daniels CW, Black EK, Schaefer FW 3rd, Belosevic M. Dose response of *Cryptosporidium parvum* in outbred neonatal CD-1 mice. *Appl Environ Microbiol.* 1993 Nov;59(11):3661-5. doi: 10.1128/aem.59.11.3661-3665.1993. PMID: 8285673; PMCID: PMC182513.

Forney JR, Yang S, Healey MC. Protease activity associated with excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Parasitol.* 1996 Dec;82(6):889-92. PMID: 8973395.

Forney JR, Yang S, Healey MC. Synergistic anticryptosporidial potential of the combination alpha-1-antitrypsin and paromomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Sep;41(9):2006-8. doi: 10.1128/AAC.41.9.2006. PMID: 9303402; PMCID: PMC164053.

Fox LM, Saravolatz LD. Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent. *Clin Infect Dis.* 2005 Apr 15;40(8):1173-80. doi: 10.1086/428839. Epub 2005 Mar 14. PMID: 15791519.

Fuentes-Vélez S, Fagoonee S, Sanginario A, Gallo V, Riganti C, Pizzi M, Altruda F, Demarchi D. Impedance-based drug-resistance characterization of colon cancer cells through real-time cell culture monitoring. *Talanta.* 2021 Jan 15;222:121441. doi: 10.1016/j.talanta.2020.121441. Epub 2020 Aug 25. PMID: 33167197.

Funkhouser-Jones LJ, Ravindran S, Sibley LD. Defining Stage-Specific Activity of Potent New Inhibitors of *Cryptosporidium parvum* Growth *In Vitro*. *mBio.* 2020 Mar 3;11(2):e00052-20. doi: 10.1128/mBio.00052-20. PMID: 32127445; PMCID: PMC7064746.

G

Gargala G, Delaunay A, Li X, Brasseur P, Favennec L, Ballet JJ. Efficacy of nitazoxanide, tizoxanide and tizoxanide glucuronide against *Cryptosporidium parvum* development in sporozoite-infected HCT-8 enterocytic cells. *J Antimicrob Chemother.* 2000 Jul;46(1):57-60. doi: 10.1093/jac/46.1.57. PMID: 10882689.

Gargala G, Le Goff L, Ballet JJ, Favennec L, Stachulski AV, Rossignol JF. Evaluation of new thiazolide/thiadiazolide derivatives reveals nitro group-independent efficacy against in vitro development of *Cryptosporidium parvum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Mar;54(3):1315-8. doi: 10.1128/AAC.00614-09. Epub 2010 Jan 4. PMID: 20047919; PMCID: PMC2825981.

Gargala G, François A, Favennec L, Rossignol JF. Activity of halogeno-thiazolides against *Cryptosporidium parvum* in experimentally infected immunosuppressed gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jun;57(6):2821-3. doi: 10.1128/AAC.01538-12. Epub 2013 Mar 11. PMID: 23478972; PMCID: PMC3716183.

- Gargala G. Drug treatment and novel drug target against *Cryptosporidium*. *Parasite*. 2008 Sep;15(3):275-81. doi: 10.1051/parasite/2008153275. PMID: 18814694.**
- Garza A, Castellanos-Gonzalez A, Griffiths J, Robinson P. Infection of immunocompetent mice with acid-water-pretreated *Cryptosporidium parvum* results in weight loss, and intestinal (structural and physiological) alterations. *Parasitol Res*. 2008 Feb;102(3):457-63. doi: 10.1007/s00436-007-0785-3. Epub 2007 Nov 28. Erratum in: *Parasitol Res*. 2008 Feb;102(3):567. PMID: 18040720.**
- Gharpure R, Perez A, Miller AD, Wikswo ME, Silver R, Hlavsa MC. Cryptosporidiosis Outbreaks - United States, 2009-2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2019 Jun 28;68(25):568-572. doi: 10.15585/mmwr.mm6825a3. PMID: 31246941; PMCID: PMC6597118.**
- Gold D, Stein B, Tzipori S. The utilization of sodium taurocholate in excystation of *Cryptosporidium parvum* and infection of tissue culture. *J Parasitol*. 2001 Oct;87(5):997- . doi: 10.1645/0022-3395(2001)087[0997:TUOSTI]2.0.CO;2. PMID: 11695421.**
- Gorla SK, McNair NN, Yang G, Gao S, Hu M, Jala VR, Haribabu B, Striepen B, Cuny GD, Mead JR, Hedstrom L. Validation of IMP dehydrogenase inhibitors in a mouse model of cryptosporidiosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(3):1603-14. doi: 10.1128/AAC.02075-13. Epub 2013 Dec 23. PMID: 24366728; PMCID: PMC3957894.**
- Graczyk Z, Chomicz L, Kozłowska M, Kazimierczuk Z, Graczyk TK. Novel and promising compounds to treat *Cryptosporidium parvum* infections. *Parasitol Res*. 2011 Sep;109(3):591-4. doi: 10.1007/s00436-011-2290-y. Epub 2011 Feb 23. PMID: 21344209; PMCID: PMC3160558.**
- Grinberg A, Markovics A, Galindez J, Lopez-Villalobos N, Kosak A, Tranquillo VM. Controlling the onset of natural cryptosporidiosis in calves with paromomycin sulphate. *Vet Rec*. 2002 Nov 16;151(20):606-8. doi: 10.1136/vr.151.20.606. PMID: 12463536.**
- Guérin A, Striepen B. The Biology of the Intestinal Intracellular Parasite *Cryptosporidium*. *Cell Host Microbe*. 2020 Oct 7;28(4):509-515. doi: 10.1016/j.chom.2020.09.007. PMID: 33031769.**
- Guitard J, Menotti J, Desveaux A, Alimardani P, Porcher R, Derouin F, Kapel N. Experimental study of the effects of probiotics on *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal rats. *Parasitol Res*. 2006 Oct;99(5):522-7. doi: 10.1007/s00436-006-0181-4. Epub 2006 Apr 13. PMID: 16612627.**
- Guo F, Zhang H, Fritzler JM, Rider SD Jr, Xiang L, McNair NN, Mead JR, Zhu G. Amelioration of *Cryptosporidium parvum* infection in vitro and in vivo by targeting parasite fatty acyl-**

coenzyme A synthetases. *J Infect Dis.* 2014 Apr 15;209(8):1279-87. doi: 10.1093/infdis/jit645. Epub 2013 Nov 23. PMID: 24273180; PMCID: PMC3969544.

Guo F, Zhang H, McNair NN, Mead JR, Zhu G. The Existing Drug Vorinostat as a New Lead Against Cryptosporidiosis by Targeting the Parasite Histone Deacetylases. *J Infect Dis.* 2018 Mar 13;217(7):1110-1117. doi: 10.1093/infdis/jix689. PMID: 29300993; PMCID: PMC5939870.

Guyot K, Sarfati C, Derouin F. Actualités sur l'épidémiologie et le diagnostic de la cryptosporidiose, feuillets de Biologie VOL LIII N°304 – Janvier 2012.

H

Han A, Yang L, Frazier AB. Quantification of the heterogeneity in breast cancer cell lines using whole-cell impedance spectroscopy. *Clin Cancer Res.* 2007 Jan 1;13(1):139-43. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1346. PMID: 17200348.

Hasan MM, Stebbins EE, Choy RKM, Gillespie JR, de Hostos EL, Miller P, Mushtaq A, Ranade RM, Teixeira JE, Verlinde CLMJ, Sateriale A, Zhang Z, Osbourn DM, Griggs DW, Fan E, Buckner FS, Huston CD. Spontaneous Selection of *Cryptosporidium* Drug Resistance in a Calf Model of Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021 May 18;65(6):e00023-21. doi: 10.1128/AAC.00023-21. PMID: 33753338; PMCID: PMC8316126.

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 Jan;74(1):99-107. doi: 10.1128/IAI.74.1.99-107.2006. PMID: 16368962; PMCID: PMC1346631.

Healey MC, Yang S, Rasmussen KR, Jackson MK, Du C. Therapeutic efficacy of paromomycin in immunosuppressed adult mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *J Parasitol.* 1995 Feb;81(1):114-6. PMID: 7876965.

Hedayatipour A, Aslanzadeh S, McFarlane N. CMOS based whole cell impedance sensing: Challenges and future outlook. *Biosens Bioelectron.* 2019 Oct 15;143:111600. doi: 10.1016/j.bios.2019.111600. Epub 2019 Aug 23. PMID: 31479988.

Heine J, Moon HW, Woodmansee DB. Persistent *Cryptosporidium* infection in congenitally athymic (nude) mice. *Infect Immun.* 1984 Mar;43(3):856-9. doi: 10.1128/iai.43.3.856-859.1984. PMID: 6607888; PMCID: PMC264261.

Hennessey KM, Rogiers IC, Shih HW, Hulverson MA, Choi R, McCloskey MC, Whitman GR, Barrett LK, Merritt EA, Paredez AR, Ojo KK. Screening of the Pathogen Box for

- inhibitors with dual efficacy against *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*.** *PLoS Negl Trop Dis.* 2018 Aug 6;12(8):e0006673. doi: 10.1371/journal.pntd.0006673. PMID: 30080847; PMCID: PMC6095626.
- Herrera-Martínez M, Orozco-Samperio E, Montañó S, Ariza-Ortega JA, Flores-García Y, López-Contreras L. Vorinostat as potential antiparasitic drug.** *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020 Jul;24(13):7412-7419. doi: 10.26355/eurrev_202007_21909. PMID: 32706080.
- Hewitt RG, Yiannoutsos CT, Higgs ES, Carey JT, Geiseler PJ, Soave R, Rosenberg R, Vazquez GJ, Wheat LJ, Fass RJ, Antoninievic Z, Walawander AL, Flanigan TP, Bender JF. Paromomycin: no more effective than placebo for treatment of cryptosporidiosis in patients with advanced human immunodeficiency virus infection.** *AIDS Clinical Trial Group. Clin Infect Dis.* 2000 Oct;31(4):1084-92. doi: 10.1086/318155. Epub 2000 Oct 25. PMID: 11049793.
- Hijjawi, N 2003. In vitro cultivation and development of *Cryptosporidium* in cell culture.** *Cryptosporidium: From Molecules to Disease, Elsevier.* pp. 233-253.
- Hommer V, Eichholz J, Petry F. Effect of antiretroviral protease inhibitors alone, and in combination with paromomycin, on the excystation, invasion and in vitro development of *Cryptosporidium parvum*.** *J Antimicrob Chemother.* 2003 Sep;52(3):359-64. doi: 10.1093/jac/dkg357. Epub 2003 Jul 29. Erratum in: *J Antimicrob Chemother.* 2003 Sep;52(3):535. PMID: 12888587.
- Hordyjewska A, Prendecka-Wróbel M, Kurach Ł, Horecka A, Olszewska A, Pigoń-Zajac D, Malecka-Massalska T, Kurzepa J. Antiproliferative Properties of Triterpenoids by ECIS Method-A New Promising Approach in Anticancer Studies?** *Molecules.* 2022 May 14;27(10):3150. doi: 10.3390/molecules27103150. PMID: 35630627; PMCID: PMC9146930.
- Houssin T, Follet J, Follet A, Dei-Cas E, Senez V. Label-free analysis of water-polluting parasite by electrochemical impedance spectroscopy.** *Biosens Bioelectron.* 2010 Jan 15;25(5):1122-9. doi: 10.1016/j.bios.2009.09.039. Epub 2009 Oct 7. PMID: 19889527.
- Houssin Timothée, 2011 (thèse). BioMEMS pour l'analyse de cellules biologiques par spectroscopie d'impédance.** *Université de Lille.*
- Hughes P, Marshall D, Reid Y, Parkes H, Gelber C. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need?** *Biotechniques.* 2007 Nov;43(5):575, 577-8, 581-2 passim. doi: 10.2144/000112598. Erratum in: *Biotechniques.* 2008 Jan;44(1):47. PMID: 18072586.

Hulverson MA, Choi R, Arnold SLM, Schaefer DA, Hemphill A, McCloskey MC, Betzer DP, Müller J, Vidadala RSR, Whitman GR, Rivas KL, Barrett LK, Hackman RC, Love MS, McNamara CW, Shaughnessy TK, Kondratiuk A, Kurnick M, Banfor PN, Lynch JJ, Freiberg GM, Kempf DJ, Maly DJ, Riggs MW, Ojo KK, Van Voorhis WC. Advances in bumped kinase inhibitors for human and animal therapy for cryptosporidiosis. *Int J Parasitol.* 2017 Oct;47(12):753-763. doi: 10.1016/j.ijpara.2017.08.006. Epub 2017 Sep 9. PMID: 28899690; PMCID: PMC5772984.

Hunter PR, Hughes S, Woodhouse S, Nicholas R, Syed Q, Chalmers RM, Verlander NQ, Goodacre J. Health sequelae of human cryptosporidiosis in immunocompetent patients. *Clin Infect Dis.* 2004 Aug 15;39(4):504-10. doi: 10.1086/422649. Epub 2004 Aug 2. PMID: 15356813.

Hunter PR, Hadfield SJ, Wilkinson D, Lake IR, Harrison FC, Chalmers RM. Subtypes of *Cryptosporidium parvum* in humans and disease risk. *Emerg Infect Dis.* 2007 Jan;13(1):82-8. doi: 10.3201/eid1301.060481. PMID: 17370519; PMCID: PMC2725800.

Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Jan;15(1):145-54. doi: 10.1128/CMR.15.1.145-154.2002. PMID: 11781272; PMCID: PMC118064.

I

Iroh Tam P, Arnold SLM, Barrett LK, Chen CR, Conrad TM, Douglas E, Gordon MA, Hebert D, Henrion M, Hermann D, Hollingsworth B, Houpt E, Jere KC, Lindblad R, Love MS, Makhaza L, McNamara CW, Nedi W, Nyirenda J, Operario DJ, Phulusa J, Quinnan GV, Sawyer LA, Thole H, Toto N, Winter A, Van Voorhis WC. Clofazimine for Treatment of Cryptosporidiosis in Human Immunodeficiency Virus Infected Adults: An Experimental Medicine, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Phase 2a Trial. *Clin Infect Dis.* 2021 Jul 15;73(2):183-191. doi: 10.1093/cid/ciaa421. PMID: 32277809; PMCID: PMC8282326.

J

Jalili-Firoozinezhad S, Gazzaniga FS, Calamari EL, Camacho DM, Fadel CW, Bein A, Swenor B, Nestor B, Cronce MJ, Tovaglieri A, Levy O, Gregory KE, Breault DT, Cabral JMS, Kasper DL, Novak R, Ingber DE. A complex human gut microbiome cultured in an anaerobic intestine-on-a-chip. *Nat Biomed Eng.* 2019 Jul;3(7):520-531. doi: 10.1038/s41551-019-0397-0. Epub 2019 May 13. Erratum in: *Nat Biomed Eng.* 2019 Jun 18;: PMID: 31086325; PMCID: PMC6658209.

- Jillani NE, Nyachio A, Chai DC, Nyariki JN. Successful experimental infant baboon model for childhood cryptosporidiosis studies. *Parasit Vectors*. 2021 Jun 10;14(1):316. doi: 10.1186/s13071-021-04804-4. PMID: 34112218; PMCID: PMC8193905.**
- Jin Z, Ma J, Zhu G, Zhang H. Discovery of Novel Anti-cryptosporidial Activities From Natural Products by *in vitro* High-Throughput Phenotypic Screening. *Front Microbiol*. 2019 Aug 29;10:1999. doi: 10.3389/fmicb.2019.01999. PMID: 31551955; PMCID: PMC6736568.**
- Johnson EH, Windsor JJ, Muirhead DE, King GJ, Al-Busaidy R. Confirmation of the prophylactic value of paromomycin in a natural outbreak of caprine cryptosporidiosis. *Vet Res Commun*. 2000 Feb;24(1):63-7. doi: 10.1023/a:1006381522986. PMID: 10703755.**
- Jumani RS, Bessoff K, Love MS, Miller P, Stebbins EE, Teixeira JE, Campbell MA, Meyers MJ, Zambriski JA, Nunez V, Woods AK, McNamara CW, Huston CD. A Novel Piperazine-Based Drug Lead for Cryptosporidiosis from the Medicines for Malaria Venture Open-Access Malaria Box. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Mar 27;62(4):e01505-17. doi: 10.1128/AAC.01505-17. PMID: 29339392; PMCID: PMC5913971.**

K

- Karanis P, Aldeyarbi HM. Evolution of *Cryptosporidium* in vitro culture. *Int J Parasitol*. 2011 Oct;41(12):1231-42. doi: 10.1016/j.ijpara.2011.08.001. Epub 2011 Aug 22. PMID: 21889507.**
- Keegan AR, Fanok S, Monis PT, Saint CP. Cell culture-Taqman PCR assay for evaluation of *Cryptosporidium parvum* disinfection. *Appl Environ Microbiol*. 2003 May;69(5):2505-11. doi: 10.1128/AEM.69.5.2505-2511.2003. PMID: 12732515; PMCID: PMC154491.**
- Khalil IA, Troeger C, Rao PC, Blacker BF, Brown A, Brewer TG, Colombara DV, De Hostos EL, Engmann C, Guerrant RL, Haque R, Houpt ER, Kang G, Korpe PS, Kotloff KL, Lima AAM, Petri WA Jr, Platts-Mills JA, Shoultz DA, Forouzanfar MH, Hay SI, Reiner RC Jr, Mokdad AH. Morbidity, mortality, and long-term consequences associated with diarrhoea from *Cryptosporidium* infection in children younger than 5 years: a meta-analyses study. *Lancet Glob Health*. 2018 Jul;6(7):e758-e768. doi: 10.1016/S2214-109X(18)30283-3. PMID: 29903377; PMCID: PMC6005120.**
- Kho DT, Johnson R, Robilliard L, du Mez E, McIntosh J, O'Carroll SJ, Angel CE, Graham ES. ECIS technology reveals that monocytes isolated by CD14+ve selection mediate greater loss of BBB integrity than untouched monocytes, which occurs to a greater extent with IL-1 β activated endothelium in comparison to TNF α . *PLoS One*. 2017 Jul 21;12(7):e0180267. doi: 10.1371/journal.pone.0180267. PMID: 28732059; PMCID: PMC5521748.**

King BJ, Hoefel D, Daminato DP, Fanok S, Monis PT. Solar UV reduces *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in environmental waters. *J Appl Microbiol.* 2008 May;104(5):1311-23. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03658.x. Epub 2008 Jan 31. PMID: 18248370.

King BJ, Keegan AR, Phillips R, Fanok S, Monis PT. Dissection of the hierarchy and synergism of the bile derived signal on *Cryptosporidium parvum* excystation and infectivity. *Parasitology.* 2012 Oct;139(12):1533-46. doi: 10.1017/S0031182012000984. Epub 2012 Aug 16. PMID: 22894830.

Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, Wu Y, Sow SO, Sur D, Breiman RF, Faruque AS, Zaidi AK, Saha D, Alonso PL, Tamboura B, Sanogo D, Onwuchekwa U, Manna B, Ramamurthy T, Kanungo S, Ochieng JB, Omore R, Oundo JO, Hossain A, Das SK, Ahmed S, Qureshi S, Quadri F, Adegbola RA, Antonio M, Hossain MJ, Akinsola A, Mandomando I, Nhampossa T, Acácio S, Biswas K, O'Reilly CE, Mintz ED, Berkeley LY, Muhsen K, Sommerfelt H, Robins-Browne RM, Levine MM. 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 Jul 20;382(9888):209-22. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60844-2. Epub 2013 May 14. PMID: 23680352.

Kumar H, Singh VB, Meena BL, Agrawal J, Beniwal S, Swami T. Pulmonary cryptosporidiosis in an immunocompetent host treated successfully with nitazoxanide. *Lung India.* 2016 Jan-Feb;33(1):69-71. doi: 10.4103/0970-2113.173085. PMID: 26933311; PMCID: PMC4748669.

L

Lee S, Harwood M, Girouard D, Meyers MJ, Campbell MA, Beamer G, Tzipori S. The therapeutic efficacy of azithromycin and nitazoxanide in the acute pig model of *Cryptosporidium hominis*. *PLoS One.* 2017 Oct 3;12(10):e0185906. doi: 10.1371/journal.pone.0185906. PMID: 28973041; PMCID: PMC5626496.

Lee S, Ginese M, Beamer G, Danz HR, Girouard DJ, Chapman-Bonofiglio SP, Lee M, Hulverson MA, Choi R, Whitman GR, Ojo KK, Arnold SLM, Van Voorhis WC, Tzipori S. Therapeutic Efficacy of Bumped Kinase Inhibitor 1369 in a Pig Model of Acute Diarrhea Caused by *Cryptosporidium hominis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018 Jun 26;62(7):e00147-18. doi: 10.1128/AAC.00147-18. PMID: 29661877; PMCID: PMC6021680.

Lee S, Ginese M, Girouard D, Beamer G, Huston CD, Osbourn D, Griggs DW, Tzipori S. Piperazine-Derivative MMV665917: An Effective Drug in the Diarrheic Piglet Model of

- Cryptosporidium hominis*. *J Infect Dis*. 2019 Jun 19;220(2):285-293. doi: 10.1093/infdis/jiz105. PMID: 30893435; PMCID: PMC7368243.
- Leitch GJ, He Q. Reactive nitrogen and oxygen species ameliorate experimental cryptosporidiosis in the neonatal BALB/c mouse model.** *Infect Immun*. 1999 Nov;67(11):5885-91. doi: 10.1128/IAI.67.11.5885-5891.1999. PMID: 10531244; PMCID: PMC96970.
- Li X, Brasseur P, Agnamey P, Leméteil D, Favennec L, Ballet JJ, Rossignol JF. Long-lasting anticryptosporidial activity of nitazoxanide in an immunosuppressed rat model.** *Folia Parasitol (Praha)*. 2003 Mar;50(1):19-22. doi: 10.14411/fp.2003.003. PMID: 12735719.
- Li K, Nader SM, Zhang X, Ray BC, Kim CY, Das A, Witola WH. Novel lactate dehydrogenase inhibitors with in vivo efficacy against *Cryptosporidium parvum*.** *PLoS Pathog*. 2019 Jul 29;15(7):e1007953. doi: 10.1371/journal.ppat.1007953. PMID: 31356619; PMCID: PMC6687188.
- Lee S, Beamer G, Tzipori S. The piglet acute diarrhea model for evaluating efficacy of treatment and control of cryptosporidiosis.** *Hum Vaccin Immunother*. 2019;15(6):1445-1452. doi: 10.1080/21645515.2018.1498436. Epub 2018 Aug 27. PMID: 30036127; PMCID: PMC6663130.
- Linderholm, Olof Pontus, 2006 (thèse). Two-dimensional microimpedance imaging for cell culture monitoring.** Lausanne, École Polytechnique Fédérale de Lausanne.
- Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, Rudan I, Campbell H, Cibulskis R, Li M, Mathers C, Black RE; Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000.** *Lancet*. 2012 Jun 9;379(9832):2151-61. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60560-1. Epub 2012 May 11. Erratum in: *Lancet*. 2012 Oct 13;380(9850):1308. PMID: 22579125.
- López-Vélez R, Tarazona R, Garcia Camacho A, Gomez-Mampaso E, Guerrero A, Moreira V, Villanueva R. Intestinal and extraintestinal cryptosporidiosis in AIDS patients.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1995 Aug;14(8):677-81. doi: 10.1007/BF01690873. PMID: 8565984.
- Love MS, Beasley FC, Jumani RS, Wright TM, Chatterjee AK, Huston CD, Schultz PG, McNamara CW. A high-throughput phenotypic screen identifies clofazimine as a potential treatment for cryptosporidiosis.** *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Feb 3;11(2):e0005373. doi: 10.1371/journal.pntd.0005373. PMID: 28158186; PMCID: PMC5310922.
- Lunde CS, Stebbins EE, Jumani RS, Hasan MM, Miller P, Barlow J, Freund YR, Berry P, Stefanakis R, Gut J, Rosenthal PJ, Love MS, McNamara CW, Easom E, Plattner JJ,**

Jacobs RT, Huston CD. Identification of a potent benzoxaborole drug candidate for treating cryptosporidiosis. *Nat Commun.* 2019 Jun 27;10(1):2816. doi: 10.1038/s41467-019-10687-y. PMID: 31249291; PMCID: PMC6597546.

M

Ma JY, Li MY, Qi ZZ, Fu M, Sun TF, Elsheikha HM, Cong W. Waterborne protozoan outbreaks: An update on the global, regional, and national prevalence from 2017 to 2020 and sources of contamination. *Sci Total Environ.* 2022 Feb 1;806(Pt 2):150562. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.150562. Epub 2021 Sep 24. PMID: 34852432.

Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ, Addiss DG, Fox KR, Rose JB, et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med.* 1994 Jul 21;331(3):161-7. doi: 10.1056/NEJM199407213310304. Erratum in: *N Engl J Med* 1994 Oct 13;331(15):1035. PMID: 7818640.

Mammeri M, Chevillot A, Thomas M, Polack B, Julien C, Marden JP, Auclair E, Vallée I, Adjou KT. Efficacy of chitosan, a natural polysaccharide, against *Cryptosporidium parvum* in vitro and in vivo in neonatal mice. *Exp Parasitol.* 2018 Nov;194:1-8. doi: 10.1016/j.exppara.2018.09.003. Epub 2018 Sep 17. PMID: 30237052.

Mancassola R, Reperant JM, Naciri M, Chartier C. Chemoprophylaxis of *Cryptosporidium parvum* infection with paromomycin in kids and immunological study. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Jan;39(1):75-8. doi: 10.1128/AAC.39.1.75. PMID: 7695333; PMCID: PMC162488.

Mancassola R, Richard A, Naciri M. Evaluation of decoquinatate to treat experimental cryptosporidiosis in kids. *Vet Parasitol.* 1997 Apr;69(1-2):31-7. doi: 10.1016/s0304-4017(96)01094-1. PMID: 9187027.

Manjunatha UH, Vinayak S, Zambriski JA, Chao AT, Sy T, Noble CG, Bonamy GMC, Kondreddi RR, Zou B, Gedeck P, Brooks CF, Herbert GT, Sateriale A, Tandel J, Noh S, Lakshminarayana SB, Lim SH, Goodman LB, Bodenreider C, Feng G, Zhang L, Blasco F, Wagner J, Leong FJ, Striepen B, Diagona TT. A *Cryptosporidium* PI(4)K inhibitor is a drug candidate for cryptosporidiosis. *Nature.* 2017 Jun 15;546(7658):376-380. doi: 10.1038/nature22337. Epub 2017 May 31. PMID: 28562588; PMCID: PMC5473467.

Marshall RJ, Flanigan TP. Paromomycin inhibits *Cryptosporidium* infection of a human enterocyte cell line. *J Infect Dis.* 1992 Apr;165(4):772-4. doi: 10.1093/infdis/165.4.772. PMID: 1552210.

- Martinez J, Montalibet A, McAdams E, Faivre M, Ferrigno R. Effect of electrode material on the sensitivity of interdigitated electrodes used for Electrical Cell-Substrate Impedance Sensing technology. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc.* 2017 Jul;2017:813-816. doi: 10.1109/EMBC.2017.8036948. PMID: 29059996.**
- McGrath JS, Honrado C, Spencer D, Horton B, Bridle HL, Morgan H. Analysis of Parasitic Protozoa at the Single-cell Level using Microfluidic Impedance Cytometry. *Sci Rep.* 2017 Jun 1;7(1):2601. doi: 10.1038/s41598-017-02715-y. PMID: 28572634; PMCID: PMC5454013.**
- Mekonnen Y, Hadush T, Tafere A, Tilahun A. A Review Article on Cryptosporidiosis. *Acta Parasitologica Globalis* 7 (3) : 94-104, 2016. Doi : 10.5829/idosi.apg.2016.7.3.10532**
- Mele R, Gomez Morales MA, Tosini F, Pozio E. *Cryptosporidium parvum* at different developmental stages modulates host cell apoptosis in vitro. *Infect Immun.* 2004 Oct;72(10):6061-7. doi: 10.1128/IAI.72.10.6061-6067.2004. PMID: 15385510; PMCID: PMC517591.**
- Miller CN, Jossé L, Brown I, Blakeman B, Povey J, Yiangou L, Price M, Cinatl J Jr, Xue WF, Michaelis M, Tsaousis AD. A cell culture platform for *Cryptosporidium* that enables long-term cultivation and new tools for the systematic investigation of its biology. *Int J Parasitol.* 2018 Mar;48(3-4):197-201. doi: 10.1016/j.ijpara.2017.10.001. Epub 2017 Nov 28. PMID: 29195082; PMCID: PMC5854368.**
- Moore D, Waters WR, Wannemuehler MJ, Harp JA. Treatment with agmatine inhibits *Cryptosporidium parvum* infection in infant mice. *J Parasitol.* 2001 Feb;87(1):211-3. doi: 10.1645/0022-3395(2001)087[0211:TWAICP]2.0.CO;2. PMID: 11227893.**
- Mosnier E, Martin N, Razakandrainibe R, Dalle F, Roux G, Buteux A, Favennec L, Brousse P, Guarmit B, Blanchet D, Epelboin L, Girouin C, Martin E, Djossou F, Nacher M, Demar M. Cryptosporidiosis Outbreak in Immunocompetent Children from a Remote Area of French Guiana. *Am J Trop Med Hyg.* 2018 Jun;98(6):1727-1732. doi: 10.4269/ajtmh.17-0609. Epub 2018 Apr 19. PMID: 29692312; PMCID: PMC6086166.**
- Murakoshi F, Bando H, Sugi T, Adeyemi OS, Nonaka M, Nakaya T, Kato K. Nullscript inhibits *Cryptosporidium* and *Toxoplasma* growth. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2020 Dec;14:159-166. doi: 10.1016/j.ijpddr.2020.10.004. Epub 2020 Oct 15. PMID: 33120250; PMCID: PMC7593347.**

N

- Naciri M, Mancassola R, Yvoré P, Peeters JE.** The effect of halofuginone lactate on experimental *Cryptosporidium parvum* infections in calves. *Vet Parasitol.* 1993 Jan;45(3-4):199-207. doi: 10.1016/0304-4017(93)90075-x. PMID: 8447063; PMCID: PMC7131353.
- Naciri M, Mancassola R, Répérant JM, Canivez O, Quinque B, Yvoré P.** Treatment of experimental ovine cryptosporidiosis with ovine or bovine hyperimmune colostrum. *Vet Parasitol.* 1994 Jun;53(3-4):173-90. doi: 10.1016/0304-4017(94)90181-3. PMID: 7975113.
- Nahid MA, Campbell CE, Fong KSK, Barnhill JC, Washington MA.** An evaluation of the impact of clinical bacterial isolates on epithelial cell monolayer integrity by the electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS) method. *J Microbiol Methods.* 2020 Feb;169:105833. doi: 10.1016/j.mimet.2020.105833. Epub 2020 Jan 2. PMID: 31904440.
- Nasir A, Avais M, Khan MS, Khan JA, Hameed S, Reichel MP.** Treating *Cryptosporidium parvum* infection in calves. *J Parasitol.* 2013 Aug;99(4):715-7. doi: 10.1645/12-42.1. Epub 2013 Jan 24. PMID: 23347204.
- Ng Hublin JS, Ryan U, Trengove R, Maker G.** Metabolomic profiling of faecal extracts from *Cryptosporidium parvum* infection in experimental mouse models. *PLoS One.* 2013 Oct 18;8(10):e77803. doi: 10.1371/journal.pone.0077803. PMID: 24204976; PMCID: PMC3800111.
- Nikolaev M, Mitrofanova O, Broguiere N, Geraldo S, Dutta D, Tabata Y, Elci B, Brandenberg N, Kolotuev I, Gjorevski N, Clevers H, Lutolf MP.** Homeostatic mini-intestines through scaffold-guided organoid morphogenesis. *Nature.* 2020 Sep;585(7826):574-578. doi: 10.1038/s41586-020-2724-8. Epub 2020 Sep 16. PMID: 32939089.
- Nydam DV, Lindergard G, Guard CL, Schaaf SL, Wade SE, Mohammed HO.** Serological detection of exposure to *Cryptosporidium parvum* in cattle by ELISA and its evaluation in relation to coprological tests. *Parasitol Res.* 2002 Sep;88(9):797-803. doi: 10.1007/s00436-002-0665-9. Epub 2002 May 9. PMID: 12172810.

O

- O'Connor RM, Nepveux V FJ, Abenoja J, Bowden G, Reis P, Beaushaw J, Bone Relat RM, Driskell I, Gimenez F, Riggs MW, Schaefer DA, Schmidt EW, Lin Z, Distel DL, Clardy J, Ramadhar TR, Allred DR, Fritz HM, Rathod P, Chery L, White J.** A symbiotic bacterium of shipworms produces a compound with broad spectrum anti-apicomplexan activity.

PLoS Pathog. 2020 May 26;16(5):e1008600. doi: 10.1371/journal.ppat.1008600. PMID: 32453775; PMCID: PMC7274485.

O'Hara SP et Chen XM. The cell biology of *Cryptosporidium* infection *Microb. Infect.*, 13 (2011), pp. 721-730. doi: 10.1016/j.micinf.2011.03.008. Epub 2011 Mar 31. PMID: 21458585; PMCID: PMC3130844.

Oboh E, Schubert TJ, Teixeira JE, Stebbins EE, Miller P, Philo E, Thakellapalli H, Campbell SD, Griggs DW, Huston CD, Meyers MJ. Optimization of the Urea Linker of Triazolopyridazine MMV665917 Results in a New Anticryptosporidial Lead with Improved Potency and Predicted hERG Safety Margin. *J Med Chem.* 2021 Aug 12;64(15):11729-11745. doi: 10.1021/acs.jmedchem.1c01136. Epub 2021 Aug 3. PMID: 34342443; PMCID: PMC8792998.

Oeyen M, Meyen E, Doijen J, Schols D. In-Depth Characterization of Zika Virus Inhibitors Using Cell-Based Electrical Impedance. *Microbiol Spectr.* 2022 Aug 31;10(4):e0049122. doi: 10.1128/spectrum.00491-22. Epub 2022 Jul 11. PMID: 35862960; PMCID: PMC9431523.

Ojo KK, Larson ET, Keyloun KR, Castaneda LJ, Derocher AE, Inampudi KK, Kim JE, Arakaki TL, Murphy RC, Zhang L, Napuli AJ, Maly DJ, Verlinde CL, Buckner FS, Parsons M, Hol WG, Merritt EA, Van Voorhis WC. Toxoplasma gondii calcium-dependent protein kinase 1 is a target for selective kinase inhibitors. *Nat Struct Mol Biol.* 2010 May;17(5):602-7. doi: 10.1038/nsmb.1818. Epub 2010 May 2. PMID: 20436472; PMCID: PMC2896873.

Okhuysen PC, Chappell CL, Crabb JH, Sterling CR, DuPont HL. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *J Infect Dis.* 1999 Oct;180(4):1275-81. doi: 10.1086/315033. PMID: 10479158.

Ollivett TL, Nydam DV, Bowman DD, Zambriski JA, Bellosa ML, Linden TC, Divers TJ. Effect of nitazoxanide on cryptosporidiosis in experimentally infected neonatal dairy calves. *J Dairy Sci.* 2009 Apr;92(4):1643-8. doi: 10.3168/jds.2008-1474. PMID: 19307646.

P

Paraud C, Pors I, Journal JP, Besnier P, Reisdorffer L, Chartier C. Control of cryptosporidiosis in neonatal goat kids: efficacy of a product containing activated charcoal and wood vinegar liquid (Obionekk®) in field conditions. *Vet Parasitol.* 2011 Aug 25;180(3-4):354-7. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.03.022. Epub 2011 Mar 24. PMID: 21497020.

Pecková, R., Stuart, P.D., Sak, B., Květoňová, D., Kváč, M., Foitová, I., 2016. Statistical comparison of excystation methods in *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Vet. Parasitol.* 230, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.10.007>

Parviz M, Toshniwal P, Viola HM, Hool LC, Fear PMW, Wood FM, Gaus K, Iyer KS, Gooding JJ. Real-Time Bioimpedance Sensing of Antifibrotic Drug Action in Primary Human Cells. *ACS Sens.* 2017 Oct 27;2(10):1482-1490. doi: 10.1021/acssensors.7b00442. Epub 2017 Sep 19. PMID: 28871791.

Pennington MR, Van de Walle GR. Electric Cell-Substrate Impedance Sensing To Monitor Viral Growth and Study Cellular Responses to Infection with Alphaherpesviruses in Real Time. *mSphere.* 2017 Apr 5;2(2):e00039-17. doi: 10.1128/mSphere.00039-17. PMID: 28405631; PMCID: PMC5381265.

Perkins ME, Wu TW, Le Blancq SM. Cyclosporin analogs inhibit in vitro growth of *Cryptosporidium parvum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Apr;42(4):843-8. doi: 10.1128/AAC.42.4.843. PMID: 9559794; PMCID: PMC105553.

Perrucci S, Fichi G, Buggiani C, Rossi G, Flamini G. Efficacy of mangiferin against *Cryptosporidium parvum* in a neonatal mouse model. *Parasitol Res.* 2006 Jul;99(2):184-8. doi: 10.1007/s00436-006-0165-4. Epub 2006 Mar 18. PMID: 16547730.

Petermann J, Paraud C, Pors I, Chartier C. Efficacy of halofuginone lactate against experimental cryptosporidiosis in goat neonates. *Vet Parasitol.* 2014 May 28;202(3-4):326-9. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.02.027. Epub 2014 Feb 22. PMID: 24636788.

Pohlenz J, Bemrick WJ, Moon HW, Cheville NF. Bovine cryptosporidiosis: a transmission and scanning electron microscopic study of some stages in the life cycle and of the host-parasite relationship. *Vet Pathol.* 1978 May;15(3):417-27. doi: 10.1177/030098587801500318. PMID: 98896.

Preiser G, Preiser L, Madeo L. An outbreak of cryptosporidiosis among veterinary science students who work with calves. *J Am Coll Health.* 2003 Mar;51(5):213-5. doi: 10.1080/07448480309596353. Erratum in: *J Am Coll Health.* 2003 May;51(6):266. PMID: 12822713.

Q

R

Ralston B, Thompson RC, Pethick D, McAllister TA, Olson ME. *Cryptosporidium andersoni* in Western Australian feedlot cattle. *Aust Vet J.* 2010 Nov;88(11):458-60. doi: 10.1111/j.1751-0813.2010.00631.x. PMID: 20973292.

- Rasmussen KR, Larsen NC, Healey MC. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in a human endometrial carcinoma cell line. *Infect Immun.* 1993 Apr;61(4):1482-5. doi: 10.1128/iai.61.4.1482-1485.1993. PMID: 8454353; PMCID: PMC281389.**
- Rasmussen KR, Healey MC. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in immunosuppressed adult mice. *Infect Immun.* 1992 Apr;60(4):1648-52. doi: 10.1128/iai.60.4.1648-1652.1992. PMID: 1548087; PMCID: PMC257042.**
- Razakandrainibe R, Diawara EHI, Costa D, Le Goff L, Lemeteil D, Ballet JJ, Gargala G, Favennec L. Common occurrence of *Cryptosporidium hominis* in asymptomatic and symptomatic calves in France. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018 Mar 29;12(3):e0006355. doi: 10.1371/journal.pntd.0006355. PMID: 29596411; PMCID: PMC5892941.**
- Rochelle PA, Marshall MM, Mead JR, Johnson AM, Korich DG, Rosen JS, De Leon R. Comparison of in vitro cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of *Cryptosporidium parvum*. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Aug;68(8):3809-17. doi: 10.1128/AEM.68.8.3809-3817.2002. PMID: 12147476; PMCID: PMC124000.**
- Rochelle PA, Ferguson DM, Johnson AM, De Leon R. Quantitation of *Cryptosporidium parvum* infection in cell culture using a colorimetric in situ hybridization assay. *J Eukaryot Microbiol.* 2001 Sep-Oct;48(5):565-74. doi: 10.1111/j.1550-7408.2001.tb00192.x. PMID: 11596921.**
- Rossignol JF, Hidalgo H, Feregrino M, Higuera F, Gomez WH, Romero JL, Padierna J, Geyne A, Ayers MS. A double-'blind' placebo-controlled study of nitazoxanide in the treatment of cryptosporidial diarrhoea in AIDS patients in Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1998 Nov-Dec;92(6):663-6. doi: 10.1016/s0035-9203(98)90804-5. PMID: 10326116.**
- Rossignol JF, Ayoub A, Ayers MS. Treatment of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum*: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled study of Nitazoxanide. *J Infect Dis.* 2001 Jul 1;184(1):103-6. doi: 10.1086/321008. Epub 2001 May 29. PMID: 11398117.**
- Rossignol JF, Kabil SM, el-Gohary Y, Younis AM. Effect of nitazoxanide in diarrhea and enteritis caused by *Cryptosporidium* species. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006 Mar;4(3):320-4. doi: 10.1016/j.cgh.2005.12.020. PMID: 16527695.**
- Rossignol JF. Nitazoxanide in the treatment of acquired immune deficiency syndrome-related cryptosporidiosis: results of the United States compassionate use program in 365 patients. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006 Sep 1;24(5):887-94. doi: 10.1111/j.1365-2036.2006.03033.x. PMID: 16918894.**

Ryan U, Hijjawi N, Xiao L. Foodborne cryptosporidiosis. *Int J Parasitol.* 2018 Jan;48(1):1-12. doi: 10.1016/j.ijpara.2017.09.004. Epub 2017 Nov 7. PMID: 29122606.

S

Santín M, Trout JM, Xiao L, Zhou L, Greiner E, Fayer R. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet Parasitol.* 2004 Jun 21;122(2):103-17. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.03.020. PMID: 15177715.

Santín M, Trout JM, Fayer R. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Vet Parasitol.* 2008 Aug 1;155(1-2):15-23. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.04.018. Epub 2008 May 10. PMID: 18565677.

Sayed FG, Hamza AI, Galal LA, Sayed DM, Gaber M. Virulence of geographically different *Cryptosporidium parvum* isolates in experimental animal model. *Ann Parasitol.* 2016 Oct 1;62(3):221-32. doi: 10.17420/ap6203.56. PMID: 27770762.

Schmidt U, Weigert M, Broaddus C, Myers G. Cell Detection with Star-Convex Polygons. In *Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention – MICCAI 2018* (pp. 265–273). Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-030-00934-2_30

Schnyder M, Kohler L, Hemphill A, Deplazes P. Prophylactic and therapeutic efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves. *Vet Parasitol.* 2009 Mar 9;160(1-2):149-54. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.10.094. Epub 2008 Nov 5. PMID: 19062195; PMCID: PMC7117045.

Schupfner M, Greif G, Lendner M, Dauschies A, Lippuner C, von Samson-Himmelstjerna G, Krücken J. Evaluation of putative anti-cryptosporidial drugs in an in vitro culture system. *Parasitol Res.* 2013 Aug;112 Suppl 1:149-62. doi: 10.1007/s00436-013-3439-7. PMID: 23765343.

Shah FJ, Caviglia C, Zór K, Carminati M, Ferrari G, Sampietro M, Martínez-Serrano A, Emnéus JK, Heiskanen AR. Impedance-based Real-time Monitoring of Neural Stem Cell Differentiation. *J Electr Bioimpedance.* 2021 Nov 20;12(1):34-49. doi: 10.2478/joeb-2021-0006. PMID: 34966467; PMCID: PMC8667812.

Shahiduzzaman M, Ras R, Widmer G. Effect of Ginsenoside-Rh2 and Curcubitacin-B on *Cryptosporidium parvum* in vitro. *Exp Parasitol.* 2020 May;212:107873. doi: 10.1016/j.exppara.2020.107873. Epub 2020 Mar 9. PMID: 32165146.

- Sherwood D, Angus KW, Snodgrass DR, Tzipori S. Experimental cryptosporidiosis in laboratory mice.** *Infect Immun.* 1982 Nov;38(2):471-5. doi: 10.1128/iai.38.2.471-475.1982. PMID: 7141705; PMCID: PMC347763.
- Snelling WJ, Xiao L, Ortega-Pierres G, Lowery CJ, Moore JE, Rao JR, Smyth S, Millar BC, Rooney PJ, Matsuda M, Kenny F, Xu J, Dooley JS. Cryptosporidiosis in developing countries.** *J Infect Dev Ctries.* 2007 Dec 1;1(3):242-56. PMID: 19734601.
- Sonoiki E, Ng CL, Lee MC, Guo D, Zhang YK, Zhou Y, Alley MR, Ah Yong V, Sanz LM, Lafuente-Monasterio MJ, Dong C, Schupp PG, Gut J, Legac J, Cooper RA, Gamo FJ, DeRisi J, Freund YR, Fidock DA, Rosenthal PJ. A potent antimalarial benzoxaborole targets a Plasmodium falciparum cleavage and polyadenylation specificity factor homologue.** *Nat Commun.* 2017 Mar 6;8:14574. doi: 10.1038/ncomms14574. PMID: 28262680; PMCID: PMC5343452.
- Sow SO, Muhsen K, Nasrin D, Blackwelder WC, Wu Y, Farag TH, Panchalingam S, Sur D, Zaidi AK, Faruque AS, Saha D, Adegbola R, Alonso PL, Breiman RF, Bassat Q, Tamboura B, Sanogo D, Onwuchekwa U, Manna B, Ramamurthy T, Kanungo S, Ahmed S, Qureshi S, Quadri F, Hossain A, Das SK, Antonio M, Hossain MJ, Mandomando I, Nhampossa T, Acácio S, Omoro R, Oundo JO, Ochieng JB, Mintz ED, O'Reilly CE, Berkeley LY, Livio S, Tennant SM, Sommerfelt H, Nataro JP, Ziv-Baran T, Robins-Browne RM, Mishcherkin V, Zhang J, Liu J, Houpt ER, Kotloff KL, Levine MM. 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 May 24;10(5):e0004729. doi: 10.1371/journal.pntd.0004729. PMID: 27219054; PMCID: PMC4878811.
- Stebbins E, Jumani RS, Klopfer C, Barlow J, Miller P, Campbell MA, Meyers MJ, Griggs DW, Huston CD. Clinical and microbiologic efficacy of the piperazine-based drug lead MMV665917 in the dairy calf cryptosporidiosis model.** *PLoS Negl Trop Dis.* 2018 Jan 8;12(1):e0006183. doi: 10.1371/journal.pntd.0006183. PMID: 29309415; PMCID: PMC5774826.
- Stiff RE, Davies AP, Mason BW, Hutchings HA, Chalmers RM. Long-term health effects after resolution of acute *Cryptosporidium parvum* infection: a 1-year follow-up of outbreak-associated cases.** *J Med Microbiol.* 2017 Nov;66(11):1607-1611. doi: 10.1099/jmm.0.000609. Epub 2017 Oct 6. PMID: 28984243.
- Striepen B. Parasitic infections: Time to tackle cryptosporidiosis.** *Nature.* 2013 Nov 14;503(7475):189-91. doi: 10.1038/503189a. PMID: 24236315.

Swale C, Bougdour A, Gnahoui-David A, Tottey J, Georgeault S, Laurent F, Palencia A, Hakimi MA. Metal-captured inhibition of pre-mRNA processing activity by CPSF3 controls *Cryptosporidium* infection. *Sci Transl Med.* 2019 Nov 6;11(517):eaax7161. doi: 10.1126/scitranslmed.aax7161. PMID: 31694928.

T

Takahashi K, Matsubayashi M, Ohashi Y, Naohara J, Urakami I, Sasai K, Kido Y, Kaneko A, Teramoto I. Efficacy of ultraviolet light-emitting diodes (UV-LED) at four different peak wavelengths against *Cryptosporidium parvum* oocysts by inactivation assay using immunodeficient mice. *Parasitol Int.* 2020 Aug;77:102108. doi: 10.1016/j.parint.2020.102108. Epub 2020 Mar 27. PMID: 32224132.

Takayama Y, Perret G, Kumemura M, Ataka M, Meignan S, Karsten SL, Fujita H, Collard D, Lagadec C, Tarhan MC. Developing a MEMS Device with Built-in Microfluidics for Biophysical Single Cell Characterization. *Micromachines (Basel).* 2018 Jun 1;9(6):275. doi: 10.3390/mi9060275. PMID: 30424208; PMCID: PMC6187549.

Tandel J, English ED, Sateriale A, Gullicksrud JA, Beiting DP, Sullivan MC, Pinkston B, Striepen B. Life cycle progression and sexual development of the apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*. *Nat Microbiol.* 2019 Dec;4(12):2226-2236. doi: 10.1038/s41564-019-0539-x. Epub 2019 Sep 2. PMID: 31477896; PMCID: PMC6877471.

Teichmann K, Kuliberda M, Schatzmayr G, Hadacek F, Joachim A. In vitro determination of anticryptosporidial activity of phytogetic extracts and compounds. *Parasitol Res.* 2012 Jul;111(1):231-40. doi: 10.1007/s00436-012-2824-y. Epub 2012 Jan 26. PMID: 22278729.

Theodos CM, Griffiths JK, D'Onfro J, Fairfield A, Tzipori S. Efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in cell culture and in animal models. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Aug;42(8):1959-65. doi: 10.1128/AAC.42.8.1959. PMID: 9687390; PMCID: PMC105716.

Thieulent CJ, Hue ES, Fortier CI, Dallemagne P, Zientara S, Munier-Lehmann H, Hans A, Fortier GD, Pitel PH, Vidalain PO, Pronost SL. Screening and evaluation of antiviral compounds against Equid alpha-herpesviruses using an impedance-based cellular assay. *Virology.* 2019 Jan 2;526:105-116. doi: 10.1016/j.virol.2018.10.013. Epub 2018 Oct 26. PMID: 30388626.

Thomson S, Hamilton CA, Hope JC, Katzer F, Mabbott NA, Morrison LJ, Innes EA. Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. *Vet Res.* 2017 Aug 11;48(1):42. doi: 10.1186/s13567-017-0447-0. PMID: 28800747; PMCID: PMC5553596.

Tyzzar EE. An extracellular Coccidium, *Cryptosporidium* Muris (Gen. Et Sp. Nov.), of the gastric Glands of the Common Mouse. *J Med Res.* 1910 Nov;23(3):487-510.3. PMID: 19971982; PMCID: PMC2098948.

U

Umejiego NN, Li C, Riera T, Hedstrom L, Striepen B. *Cryptosporidium* parvum IMP dehydrogenase: identification of functional, structural, and dynamic properties that can be exploited for drug design. *J Biol Chem.* 2004 Sep 24;279(39):40320-7. doi: 10.1074/jbc.M407121200. Epub 2004 Jul 21. PMID: 15269207.

Upton SJ, Tilley M, Brillhart DB. Effects of select medium supplements on in vitro development of *Cryptosporidium* parvum in HCT-8 cells. *J Clin Microbiol.* 1995 Feb;33(2):371-5. doi: 10.1128/jcm.33.2.371-375.1995. PMID: 7714194; PMCID: PMC227950.

Ursini T, Moro L, Requena-Méndez A, Bertoli G, Buonfrate D. A review of outbreaks of cryptosporidiosis due to unpasteurized milk. *Infection.* 2020 Oct;48(5):659-663. doi: 10.1007/s15010-020-01426-3. Epub 2020 Apr 15. PMID: 32297163.

V

Vélez J, Silva LMR, Kamena F, Dauschies A, Mazurek S, Taubert A, Hermosilla C. The Oesophageal Squamous Cell Carcinoma Cell Line COLO-680N Fails to Support Sustained *Cryptosporidium parvum* Proliferation. *Pathogens.* 2021 Dec 31;11(1):49. doi: 10.3390/pathogens11010049. PMID: 35055997; PMCID: PMC8778297.

Verdon R, Polianski J, Gaudebout C, Marche C, Garry L, Pocidalo JJ. Evaluation of curative anticryptosporidial activity of paromomycin in a dexamethasone-treated rat model. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994 Jul;38(7):1681-2. doi: 10.1128/AAC.38.7.1681. PMID: 7979310; PMCID: PMC284618.

Vermeulen LC, Benders J, Medema G, Hofstra N. Global *Cryptosporidium* Loads from Livestock Manure. *Environ Sci Technol.* 2017 Aug 1;51(15):8663-8671. doi: 10.1021/acs.est.7b00452. Epub 2017 Jul 11. PMID: 28654242; PMCID: PMC5645758.

Viel H, Rocques H, Martin J, Chartier C. Efficacy of nitazoxanide against experimental cryptosporidiosis in goat neonates. *Parasitol Res.* 2007 Dec;102(1):163-6. doi: 10.1007/s00436-007-0744-z. Epub 2007 Sep 15. PMID: 17874133.

Vinayak S, Pawlowic MC, Sateriale A, Brooks CF, Studstill CJ, Bar-Peled Y, Cipriano MJ, Striepen B. Genetic modification of the diarrhoeal pathogen *Cryptosporidium* parvum.

Nature. 2015 Jul 23;523(7561):477-80. doi: 10.1038/nature14651. Epub 2015 Jul 15. PMID: 26176919; PMCID: PMC4640681.

Vinayak S, Jumani RS, Miller P, Hasan MM, McLeod BI, Tandel J, Stebbins EE, Teixeira JE, Borrel J, Gonse A, Zhang M, Yu X, Wernimont A, Walpole C, Eckley S, Love MS, McNamara CW, Sharma M, Sharma A, Scherer CA, Kato N, Schreiber SL, Melillo B, Striepen B, Huston CD, Comer E. Bicyclic azetidines kill the diarrheal pathogen *Cryptosporidium* in mice by inhibiting parasite phenylalanyl-tRNA synthetase. *Sci Transl Med*. 2020 Sep 30;12(563):eaba8412. doi: 10.1126/scitranslmed.aba8412. PMID: 32998973; PMCID: PMC8381743.

Viu M, Quílez J, Sánchez-Acedo C, del Cacho E, López-Bernad F. Field trial on the therapeutic efficacy of paromomycin on natural *Cryptosporidium parvum* infections in lambs. *Vet Parasitol*. 2000 Jun 27;90(3):163-70. doi: 10.1016/s0304-4017(00)00241-7. PMID: 10841996.

W

Wallace MR, Nguyen MT, Newton JA Jr. Use of paromomycin for the treatment of cryptosporidiosis in patients with AIDS. *Clin Infect Dis*. 1993 Dec;17(6):1070-1. doi: 10.1093/clinids/17.6.1070. PMID: 8161375.

Wang L, Wang L, Yin H, Xing W, Yu Z, Guo M, Cheng J. Real-time, label-free monitoring of the cell cycle with a cellular impedance sensing chip. *Biosens Bioelectron*. 2010 Jan 15;25(5):990-5. doi: 10.1016/j.bios.2009.09.012. Epub 2009 Sep 15. PMID: 19818595.

Wang RJ, Li JQ, Chen YC, Zhang LX, Xiao LH. Widespread occurrence of *Cryptosporidium* infections in patients with HIV/AIDS: Epidemiology, clinical feature, diagnosis, and therapy. *Acta Trop*. 2018 Nov;187:257-263. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.08.018. Epub 2018 Aug 15. PMID: 30118699.

White AC Jr, Chappell CL, Hayat CS, Kimball KT, Flanigan TP, Goodgame RW. Paromomycin for cryptosporidiosis in AIDS: a prospective, double-blind trial. *J Infect Dis*. 1994 Aug;170(2):419-24. doi: 10.1093/infdis/170.2.419. PMID: 8035029.

Widmer G, Köster PC, Carmena D. *Cryptosporidium hominis* infections in non-human animal species: revisiting the concept of host specificity. *Int J Parasitol*. 2020 Apr;50(4):253-262. doi: 10.1016/j.ijpara.2020.01.005. Epub 2020 Mar 20. PMID: 32205089.

Widmer G, Klein P, Bonilla R. Adaptation of *Cryptosporidium* oocysts to different excystation conditions. *Parasitology*. 2007 Oct;134(Pt 11):1583-8. doi: 10.1017/S0031182007002922. Epub 2007 May 17. PMID: 17506930.

Wilke G, Funkhouser-Jones LJ, Wang Y, Ravindran S, Wang Q, Beatty WL, Baldrige MT, VanDussen KL, Shen B, Kuhlenschmidt MS, Kuhlenschmidt TB, Witola WH, Stappenbeck TS, Sibley LD. **A Stem-Cell-Derived Platform Enables Complete *Cryptosporidium* Development In Vitro and Genetic Tractability.** *Cell Host Microbe*. 2019 Jul 10;26(1):123-134.e8. doi: 10.1016/j.chom.2019.05.007. Epub 2019 Jun 20. PMID: 31231046; PMCID: PMC6617391.

Woolsey ID, Zeller WE, Blomstrand BM, Øines Ø, Enemark HL. **Effects of selected condensed tannins on *Cryptosporidium parvum* growth and proliferation in HCT-8 cell cultures.** *Exp Parasitol*. 2022 Oct;241:108353. doi: 10.1016/j.exppara.2022.108353. Epub 2022 Aug 19. PMID: 35995247.

X

Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. ***Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health.** *Clin Microbiol Rev*. 2004 Jan;17(1):72-97. doi: 10.1128/CMR.17.1.72-97.2004. PMID: 14726456; PMCID: PMC321466.

Y

Yang S, Benson SK, Du C, Healey MC. **Infection of immunosuppressed C57BL/6N adult mice with a single oocyst of *Cryptosporidium parvum*.** *J Parasitol*. 2000 Aug;86(4):884-7. doi: 10.1645/0022-3395(2000)086[0884:IOICAM]2.0.CO;2. PMID: 10958482.

Yang, Z., Benhabiles, H., Windal, F., Follet, J., Leniere, A.C., Collard, D. (2022). **A Coarse-to-Fine Segmentation Methodology Based on Deep Networks for Automated Analysis of *Cryptosporidium* Parasite from Fluorescence Microscopic Images.** In: Huo, Y., Millis, B.A., Zhou, Y., Wang, X., Harrison, A.P., Xu, Z. (eds) *Medical Optical Imaging and Virtual Microscopy Image Analysis. MOVI 2022. Lecture Notes in Computer Science, vol 13578.* Springer, Cham. [https://doi: 10.1007/978-3-031-16961-8_16](https://doi.org/10.1007/978-3-031-16961-8_16)

You X, Arrowood MJ, Lejkowski M, Xie L, Schinazi RF, Mead JR. **A chemiluminescence immunoassay for evaluation of *Cryptosporidium parvum* growth in vitro.** *FEMS Microbiol Lett*. 1996 Mar 1;136(3):251-6. doi: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08057.x. PMID: 8867380.

You X, Schinazi RF, Arrowood MJ, Lejkowski M, Juodawlkis AS, Mead JR. **In-vitro activities of paromomycin and lasalocid evaluated in combination against *Cryptosporidium parvum*.** *J Antimicrob Chemother*. 1998 Feb;41(2):293-6. doi: 10.1093/jac/41.2.293. PMID: 9533476.

You X, Mead JR. Characterization of experimental *Cryptosporidium parvum* infection in IFN-gamma knockout mice. *Parasitology*. 1998 Dec;117 (Pt 6):525-31. doi: 10.1017/s0031182098003424. PMID: 9881376.

Z

Zambriski JA, Nydam DV, Bowman DD, Bellosa ML, Burton AJ, Linden TC, Liotta JL, Ollivett TL, Tondello-Martins L, Mohammed HO. Description of fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in experimentally challenged dairy calves. *Parasitol Res*. 2013 Mar;112(3):1247-54. doi: 10.1007/s00436-012-3258-2. Epub 2013 Jan 13. PMID: 23315189; PMCID: PMC7088138.

Zandi K. A Real-Time Cell Analyzing Assay for Identification of Novel Antiviral Compounds against Chikungunya Virus. *Methods Mol Biol*. 2016;1426:255-62. doi: 10.1007/978-1-4939-3618-2_23. PMID: 27233278.

Zhang H, Zhu G. High-Throughput Screening of Drugs Against the Growth of *Cryptosporidium parvum* In Vitro by qRT-PCR. *Methods Mol Biol*. 2020;2052:319-334. doi: 10.1007/978-1-4939-9748-0_18. PMID: 31452170.

Zost SJ, Gilchuk P, Chen RE, Case JB, Reidy JX, Trivette A, Nargi RS, Sutton RE, Suryadevara N, Chen EC, Binshtein E, Shrihari S, Ostrowski M, Chu HY, Didier JE, MacRenaris KW, Jones T, Day S, Myers L, Eun-Hyung Lee F, Nguyen DC, Sanz I, Martinez DR, Rothlauf PW, Bloyet LM, Whelan SPJ, Baric RS, Thackray LB, Diamond MS, Carnahan RH, Crowe JE Jr. Rapid isolation and profiling of a diverse panel of human monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2 spike protein. *Nat Med*. 2020 Sep;26(9):1422-1427. doi: 10.1038/s41591-020-0998-x. Epub 2020 Jul 10. PMID: 32651581; PMCID: PMC8194108.