

## ETUDE IN VITRO INHIBITION D'INVASION DES SPOROZOÏTES D'*Eimeria stiedae* DANS DES CELLULES MDBK (MADIN-DARBY-BOVIN-KIDNEY).

H. TAZKA

INRAA, CRP Mehdi Boualem, Laboratoire de Zootechnie BP 37, BARAKI, Alger.

**Résumé :** La coccidiose est une maladie qui entraîne d'énormes conséquences sur l'industrie des élevages de poulets et de lapins.

Pour le développement d'un vaccin biologique dirigé contre les coccidies, une banque d'ADN génomique d'*Eimeria stiedae* a été construite dans le vecteur d'expression  $\lambda$ gt11.

Le criblage de la banque avec un antisérum de lapin dirigé contre les sporozoïtes d'*E. stiedae* a identifié les recombinants exprimant des antigènes d'*E. stiedae*. Sur 3 clones recombinants identifiés, un clone (Est. R1) positif a été choisi pour une analyse plus approfondie. Ce clone génomique contient un insert EcoR1 de 1200 pb. La séquence de ce fragment a décelé une phase ouverte de lecture de 741 nucléotides qui débute à partir du site EcoR1 et correspondant à une protéine de poids moléculaire de 27,5 kd.

L'antisérum dirigé contre la protéine de fusion  $\beta$  - galactosidase reconnaît une protéine de 40 kd, sur des extraits d'antigènes d'oocystes sporulés et non sporulés d'*E. stiedae*, et sur des oocystes sporulés d'*E. magna* et d'*E. intestinalis*.

Une protéine de plus haut poids moléculaire (45 kd) est détectée chez *Eimeria tenella* (parasite du poulet).

L'analyse de l'immunofluorescence indirecte a montré que cet antigène est localisé dans la région membranaire interne du sporozoïte *E. stiedae* et au niveau du corps réfringent chez *E. magna* et *E. Intestinalis*.

L'étude in-vitro a démontré que l'antisérum, dirigé contre la protéine de fusion après 6h d'incubation, induit une réduction de pénétration de sporozoïtes dans les cultures de cellules MDBK de 43 %.

**Mots clés :** *Eimeria*, sporozoïte, antigène, vaccin génie-génétique, in-vitro.

**Abstract :** *Coccidiosis is a disease which causes an economic importance in the poultry and rabbit industry.*

*As an initial step in the development of a genetically engineered vaccine against coccidiosis, a library of EcoR1-digested genomic DNA from Eimeria stiedae has been constructed in E.coli using the expression vector  $\lambda$ gt11. Screening of the library with an antiserum raised in rabbits against purified E. stiedae sporozoites resulted in the identification of 3 immunoreactive clones.*

*One of these clone Est. R1 was chosen for further characterisation. This Est. R1 genomic clone had an EcoR1 insert of 1 200 pb.*

*DNA sequence analysis of Est.R1 revealed an open reading frame of 741 bp corresponding to a polypeptide of 27,5 kd corresponding to the C-terminal end of a 40 kd protein detected in western-blot of sporulated and non-sporulated E.stiedae oocysts incubated with an antiserum against the recombinant  $\beta$ -gal/fusion protein.*

*In addition, we demonstrated that this antigen (40 kd) is conserved in Eimeria magna and Eimeria intestinalis while the reacting protein in Eimeria tenella (the chicken coccidia) showed a higher molecular weight of 45 kd.*

*Fluorescence staining was seen in the membrane of the parasite of E.stiedae. with E.magna and E.intestinalis it was localised in the refractile body.*

*The antiserum was tested for its ability to inhibit invasion of cell cultures (MDBK) by sporozoites in vitro. After 6h incubation, the treatment with antiserum caused a reduction of cell invasion by sporozoites (approximately 43%) suggesting that the antiserum appeared to inhibit sporozoite invasion.*

**Key words :** *Eimeria, sporozoite, antigen, genetic-engineer vaccine, in-vitro.*

## INTRODUCTION

La culture *in vitro* des protozoaires est devenue de nos jours de plus en plus courante. En comparaison avec la méthode *in-vivo* cette technique offre plusieurs avantages et est utilisée essentiellement comme technique de supplément et parfois même comme remplacement d'expérience *in-vivo*.

Des recherches préliminaires de culture *in-vitro* sur les espèces *Eimeria* ont été réalisées principalement sur *E. tenella*, espèce pathogène du poulet. Ces premières tentatives ont été effectuées par Patton (1965) sur différentes types de cultures de cellules (les cellules de rein de bovin, les fibroblastes de cailles et de souris). Il a mentionné le développement des schizontes d'*E. tenella* de 1<sup>ère</sup> génération dans les cultures de cellules de rein de bovin, d'embryons de caille japonaise, et de fibroblastes d'embryon de poussin. Strout et al, (1965) ont également rapporté l'établissement des sporozoïtes d'*E. acervulina* dans les cultures de reins d'embryon de poussin, de fibroblastes d'embryon de poussin et de souris.

Plusieurs travaux ont décrit le développement des sporozoïtes jusqu'au stade méronts chez le genre *Eimeria* (Doran, 1973) et ce n'est qu'avec l'espèce *E. tenella* qu'un cycle complet fut réalisé (Bedrnik, 1967 ; Doran, 1970, 1973 ; Strout et Ouellette, 1970 ; Doran et Augustine, 1973).

Chez l'espèce *E. magna*, le développement des schizontes de 1<sup>ère</sup> et de 2<sup>ème</sup> génération dans les cultures de cellules MDBK ainsi que la formation de mérozoïtes en gamétocytes puis en oocystes ont été étudiés (Speer et Hammond, 1971 ; 1972 ; Speer, 1979).

Les travaux sur l'inhibition de l'invasion des sporozoïtes *in-vitro* ont été menés par plu-

sieurs auteurs. Les anticorps monoclonaux, dirigés contre la surface du sporozoïtes d'*E. tenella*, inhibent la pénétration et le développement du parasite dans les cultures de cellules des reins de poulet (Danforth, 1983). Les anticorps monoclonaux, dirigés contre les sporozoïtes ou les mérozoïtes de 4 espèces *Eimeria*, ont été testés pour leur capacité d'inhiber l'invasion des sporozoïtes dans les cultures de cellules de rein de poulet. Sur les 16 anticorps examinés, 5 ont démontré une activité inhibitrice (Augustine et Danforth, 1985).

Crane et al, (1986) ont caractérisé des anticorps monoclonaux et polyclonaux, dirigés contre les sporozoïtes d'*E. tenella*, qui inhibent également l'invasion des sporozoïtes *in-vitro*.

Dans l'étude présente, le sérum polyclonal, dirigé contre la protéine recombinante Est.R1, a été testé pour sa capacité de neutraliser l'infektivité des sporozoïtes d'*E. stiedae* *in-vitro*. Le sérum SPF-SN (présérum) a été employé comme contrôle négatif.

Cette expérimentation fait suite aux travaux de recherche qui ont été publiés dans la revue recherche agronomique I.N.R.A.A (Tazka et al, 1998).

## I - MATERIEL ET METHODES

### 1 - Parasite :

Pour l'étude *in-vitro*, nous avons travaillé avec une souche (U82/129) d'*Eimeria stiedae* obtenue auprès du Dr Peeters (NIDO, Belgique).

## 2 - Oocystes :

Les oocystes ont été extraits à partir du foie et des canaux biliaires de lapins infectés par voie orale avec  $2.10^4$  oocystes sporulés d'*E.stiedae*. Après plusieurs lavages, ils sont mis à sporuler dans 2,5 % de bichromate de potassium pendant 48h puis conservés à 4°C jusqu'à utilisation.

## 3 - Sporozoïtes :

Les oocystes sporulés, stockés dans du bichromate de potassium à 4°C, sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min, le culot est lavé à plusieurs reprises avec du PBS stérile. Une solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) de 5,5 % est ajouté au culot, le mélange est homogénéisé puis incubé à 4°C pendant 60 min.

Les traces de NaOCl sont éliminées par plusieurs lavages et les oocystes sont ensuite broyés à l'aide d'un broyeur de Potter dans une solution de PBS stérile.

Les sporocystes libérés sont incubés à 41°C pendant 15 min dans une solution d'excystation contenant 0,25 % de trypsine et 0,1 % d'acide glycodéoxycholique pour la libération des sporozoïtes. Après centrifugation à 3.000 rpm pendant 10 min, les sporozoïtes isolés sont purifiés sur une colonne de coton stérile selon la méthode de Bontemps et Yvoré, (1974).

Le nombre de sporozoïte/ml est déterminé par comptage au microscope à l'aide de la cellule hematocryptomètre. Les comptages sont effectués avant et après purification des sporozoïtes.

## 4 - Milieu de culture :

Le milieu de culture utilisé est le DMEM, constitué de 90 % Dulbecco's Modified Essential Medium, 10% FCS (Foetal-Calf-

Serum), 0,03 % L-glutamine, 50 U/ml penicilline, 50 µg/ml streptomycine.

## 5 - Culture de cellules :

Les cultures de cellule " Madin-Darby-Bovine-Kidney "(MDBK), collection ATCC, ont été utilisées pour l'étude du processus de pénétration des sporozoïtes d' *E. stiedae* dans les cellules.

## 6 - Préparation des couches monocellulaires (monolayer) :

Les cellules MDBK sont mises en culture dans des boîtes de Pétri (100 mm-20 mm, Falcon) contenant le milieu de culture DMEM à 37°C, sous une atmosphère humide de 5% CO<sub>2</sub>, jusqu'à obtention d'une couche mono-cellulaire confluite ( 2 à 3 jours).

Une solution "Modified Puck's saline A" (GIBCO, BRL) contenant en plus 0,5 % trypsine, 0,2 % EDTA est ajoutée à raison de 2,5 ml/boîte de Pétri. Les cellules sont réincubées à 37 °C jusqu'à ce qu'elles se détachent de la paroi des boîtes de Pétri.

Le contenu est mis dans un tube Falcon de 50 ml et centrifugé à 1200 rpm pendant 10 min à température ambiante. Le culot est resuspendu dans 1 ml de milieu de culture (DMEM) contenant 10% de DMSO (Dimethylsulfoxyde). Ces cellules sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

## 7 - Sérum polyclonal recombinant SPF α Est.R1

Des lapins SPF (Specific-Pathogen-Free) ont été immunisés par voie sous cutanée à trois semaines d'intervalles avec 3 doses de 100 mg de protéine de fusion β-galactosidase électroéluee. La première dose a été émulsifiée avec l'adjuvant complet de Freund et les doses suivantes avec l'adjuvant incomplet de Freund.

Les lapins ont été saignés par ponction à l'oreille 10 jours après la dernière immunisation.

### 8 - Infection des cellules MDBK par les sporozoïtes d'*E. stiedae*

Pour la préparation des cultures de cellules, des plaques multi-puits pour culture de tissus avec 6 cuvettes à fond plat (Falcon) ont été utilisées.

On ajoute aux cellules MDBK (préalablement préparées et conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ ) 50 ml de milieu de culture (DMEM) afin de diluer le DMSO. Les cellules sont centrifugées à 1200 rpm pendant 10 min à température ambiante et le culot est resuspendu dans la même solution 2 ml du mélange sont mis dans chaque puit contenant des lamelles couvre objet.

Les cellules sont cultivées à  $37^{\circ}\text{C}$  sous une atmosphère humide de 5 %  $\text{CO}_2$  jusqu'à l'obtention d'une couche complète mono-cellulaire.

Les sporozoïtes d'*E. stiedae*, suspendu dans le milieu de culture à une concentration de  $5.10^4$  sp/ml, sont ajoutés au sérum recombinant SPF  $\alpha$  Est.R1 dilué 1/200 (DMEM) ou du présérum SPF-SN. Après homogénéisation, 2 ml de chaque solution sont rajoutés dans les puits sur les couches monocellulaires et les cellules sont réincubées dans les mêmes conditions de température, d'humidité, et de  $\text{CO}_2$  que précédemment.

Après chaque heure d'incubation, les lamelles sont retirées des puits et fixées dans la solution de Helly (2,5 % (p/v) dichromate de potassium, 5 % (p/v) oxyde II Hg (Parker, 1961) pendant 20 min. Elles sont lavées à l'eau stérile et conservées dans de l'éthanol à 70 % pour une utilisation ultérieure.

Ces lamelles sont examinées au microscope Leitz (Wetzlar) pour la détection de la présence des parasites intracellulaires. Une moyenne de 5 champs par lame examinée a été comptée à un agrandissement de 400.

## II - RESULTATS

Pour l'étude de l'inhibition de la pénétration des sporozoïtes d'*E. stiedae* dans les cellules MDBK, les sporozoïtes, resuspendu dans le milieu de culture DMEM, contenant soit le sérum recombinant (SPF  $\alpha$  EST.R1) soit le présérum (SPF-SN) (dilution 1/200), ont été directement mis à incuber sur les couches de cellules mono-cellulaires. Chaque incubation a été menée en duplicat, les résultats sont exprimés en nombre de parasites intracellulaires par une moyenne de 5 champs.

Après 1 heure d'inoculation, on observe une invasion des sporozoïtes à l'intérieur des cellules MDBK et le nombre de sporozoïtes augmente avec le temps d'incubation. A chaque heure, le comptage des parasites intracellulaires est réalisé. Le résultat de l'examination microscopique des sporozoïtes sont rapportés au tableau I. (fig 1)

Peu de sporozoïtes ont été trouvés dans les cellules prétraitées avec le sérum recombinant (SPF  $\alpha$  Est.R1) comparés au contrôle négatif (SPF-SN). En effet, après 6 heures d'invasion, on constate une réduction de sporozoïtes dans les cellules prétraitées de 43 %. Le traitement des cellules avec l'antisérum semble donc inhiber la pénétration des sporozoïtes dans les cultures de cellules MDBK.

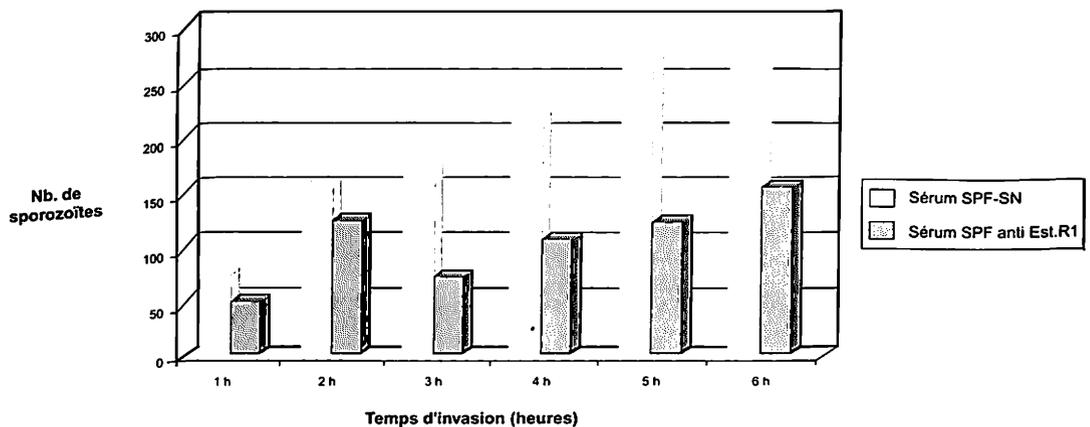


Figure 1 : Invasion des cellules MDBK par les sporozoïtes d'*E. stiedae* qui ont été prétraitées avec le sérum recombinant (SPF  $\alpha$  Est.R1) et le présérum (SPF-SN).

Tableau I : Invasion des cellules MDBK par les sporozoïtes d'*E. stiedae* qui ont été prétraitées avec le sérum recombinant (SPF  $\alpha$  Est.R1) et le présérum (SPF-SN).

Nombre d'heures	Nombre de sporozoïtes intracellulaires/5 champs					
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Sérum SPF-SN	72	151	165	214	265	265
Sérum SPF $\alpha$ Est.R1	47	120	110	103	119	151
Réduction (%)	35	21	33	52	55	43

### III - DISCUSSION

La technique *in-vitro* sur l'invasion des sporozoïtes d'*Eimeria* dans les cultures de cellules offre plusieurs avantages en comparaison à la méthode *in-vivo*, telle que par exemple la détermination rapide de l'activité anticoccidiale du sérum à tester.

L'expérience décrite dans ce chapitre, sur l'invasion des sporozoïtes d'*E. stiedae* dans les cultures de cellules MDBK, montre que le traitement avec le sérum recombinant (SPF  $\alpha$  Est.R1) cause une réduction d'invasion cellulaire par les sporozoïtes.

Le mécanisme d'action des anticorps protecteurs n'est actuellement pas connu et il est en effet difficile de l'expliquer. Mais la technique en elle-même présente un intérêt certain du fait qu'elle apporte des informations rapides sur le sérum à tester.

Dans cette étude, le sérum recombinant ou le présérum ainsi que les sporozoïtes ont été ajoutés simultanément à la couche monocellulaire (monolayer) d'où probablement l'existence d'une interaction entre l'anticorps et le sporozoïte. Dans le cas d'un prétraitement prolongé de l'antisérum sur les sporozoïtes il serait possible que l'inhibition de l'invasion soit plus importante.

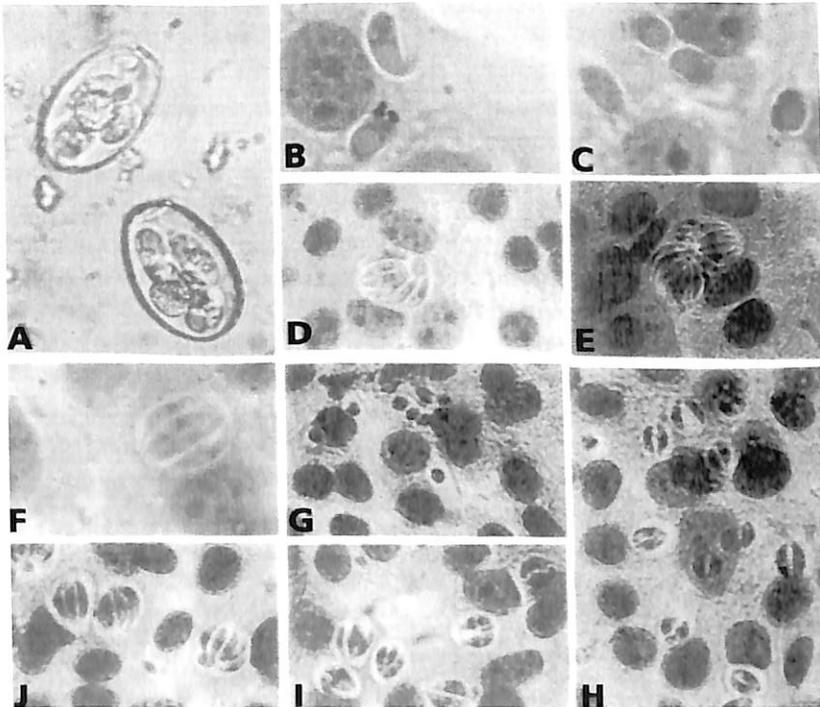
Danforth (1983) a démontré qu'une durée d'incubation plus longue d'un anticorps avec les sporozoïtes réduit considérablement la pénétration et le développement du parasite dans les cultures de cellules. En effet, un prétraitement des sporozoïtes d'*E. tenella* avec des anticorps monoclonaux d'une durée de 45 min à température ambiante présentait un plus grand effet d'inhibition sur la pénétration et le développement du parasite comparé avec un prétraitement d'une durée de 15 min.

Les résultats que nous avons obtenus ne sont pas très différents de ceux obtenus chez le poulet par Augustine et Danforth, (1987a). Il ont démontré que deux anticorps monoclonaux dirigés contre le sporozoïtes d'*E. adenoeide* inhibent l'invasion cellulaire de 46 et 55 % respectivement et les trois autres monoclonaux qui réagissent à la surface du sporozoïtes d'*E. tenella* cause une réduction de 63,57 et 37 % respectivement.

Des expériences sur le développement d'*E. magna* et d'*E. stiedae* dans les cultures de cellule MDBK et l'étude de l'effet de l'anticorps monoclonal dirigé contre le corps réfringent des sporozoïtes d'*E. magna* ont été menées (Janssens, 1992 ; Comm. Pers.). Il a conclu que, l'espèce *E. stiedae* n'était pas en mesure de se développer dans ces cellules, tandis qu'avec *E. magna*, il a observé un développement

jusqu'à la 2<sup>ème</sup> génération de schizonte (Fig. 2). En effet, le stimulus ou la substance manquante dans les cultures de cellules qui empêche la croissance et la différenciation de certaines espèces *Eimeria* n'ont pas encore été identifiés (Fernando, 1985). Quant à la souche précocose (*E. magna*), le développement se faisait plus rapidement par rapport à la souche parentale (1980/18, INRA-Tours) et l'anticorps monoclonal influençait négativement sur la pénétration et le développement des sporozoïtes d'*E. magna* dans les cellules.

Dans cette présente étude, l'inféctivité réduite est probablement le critère le plus pertinent de l'activité de l'antisérum (SPF  $\alpha$  Est.R1) et ce résultat nous a permis d'envisager des essais *in vivo* sur des lapins SPF pour une éventuelle protection.



**Figure 2 :** Cycle de développement d'*E. magna* *in vitro* (B à J) dans les cellules de culture MDBK après fixation par le liquide de Helly et coloration à l'haematoxyline (A : préparation non colorée).

**A** - Oocystes sporulés    **B** - Sporozoïtes juste après invasion    **C** - Sporozoïtes ayant la forme ronde  
**D à F** - Première génération de schizontes, (D) présence du corps réfringent très visible.  
**G** - Première génération de mérozoïtes    **H à J** - Deuxième génération de schizontes. (Janssens, 1992).

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **AUGUSTINE, P.C AND DANFORTH, H.D (1985)** ; Effects of hybridoma antibodies on invasion of cultured cells by sporozoites of *Eimeria*. Avian, Dis 29, 1212 - 1223.
- **AUGUSTINE, P.C AND DANFORTH, H.D (1987A)** ; Use of monoclonal antibodies to study the invasion of cells by *Eimeria* sporozoites. In : Molecular strategies of parasitic invasion, N. Agabiam, H. Goodman and N. Noguiera (eds). UCLA Symposium on molecular and cellular, Biology, new series, vol.32, Alan R. Liss, Inc. New York. pp 511- 520
- **BEDRNIK, P, (1967)** ; Development of sexual stages and oocysts from 2<sup>nd</sup> generation *Eimeria tenella* merozoites in cultures. Fol. Parasitol. 14,364.
- **CRANE, M.S.J ; NORMA, D.J ; GNOZZIO, M.J ; TATE, A.C ; GAMMON, M. AND MURRAY, P.K (1986)** ; *Eimeria tenella* : Quantitative in vitro and in vitro studies on the effects of mouse polyclonal and monoclonal antibodies on sporozoites. Paraist, Immunol. 8, 467- 480
- **DANFORTH, H.D (1983)** ; Use of monoclonal antibodies directed against *Eimeria tenella* sporozoites to determine stage specificity and in vitro effect on parasite penetration and development. Am. J. vet. Res . 44, 1722 - 1727
- **DORAN, D.J (1973)** ; Cultivation of coccidia in avian embryos and cell culture. In : The coccidia : *Eimeria*, *Isospora*, *Toxoplasma*, and related genera. D.M Hammond and P.L Long (eds). University Park Press, Baltimore, pp 183 - 252
- **DORAN, D.J (1970)** ; *Eimeria tenella* : From sporozoites to oocysts in cell culture. Proc. Helm. Soc. Wash. 70, 84 - 92
- **DORAN, D.J AND AUGUSTINE, P.C (1973)** ; Comparative and development of *Eimeria tenella* from sporozoites to oocysts in primary kidney Cell cultures from gallinaceous birds J. Protozool. 20, 658 - 661.
- **FERNANDO, M.A (1985)** ; *Eimeria* : parasite cell interaction Proceeding of the Georgia Coccidiosis Conference 18-20 novembre 1985 Research in Avian Coccidiosis. L.R. MC Dougald, L.P Joyner and P.L long (eds.) pp, 36 - 45
- **JANSSENS, T. (1992)** ; Het effect van monoclonale antilichamen, gericht tegen de refractile body, op de ontwikkeling van *Eimeria magna* in vitro. Graad van licentiaat in de dierkundige wetenschappen, Vrije universiteit Brussel (VUB).
- **PATTON, W.H (1965)** ; *Eimeria tenella* : Cultivation of the asexual stages in cultured animals cells, *Science*. 150, 767 - 769.
- **SPEER, C.A. AND HAMMOND, D.M. (1971)** ; Development of first and second generation schizonts of *Eimeria magna* from the rabbit in cell culture. Z. Parazitenk. 37, 336 - 353.
- **SPEER, C.A. AND HAMMOND, D.M (1972)** ; Development of gametocytes and oocysts of *Eimeria magna* from rabbits in cell culture. Proc. Helm. Soc. Wash. 39, 114 - 118.
- **SPEER, C.A (1979)** ; Further studies on the development of gamonts and oocysts of *Eimeria magna* in cultured cells. J. Parasitol. 65, 591 - 598.
- **STROUT, R ; G. SOLIS, J., SMITH, S.C AND SUNLOP, W.R (1965)** ; In vitro cultivation of *Eimeria acervulina* (coccidia). Exper. Parasit. 17, 241 - 246.

• **STROUT, R.G OUELLETTE, C.A. (1970) ;** Schizogony and gametogony of *Eimeria tenella* in cell culture. Am. J. Vet Res 321, 911 - 918.

• **TAZKA, H., REVETS, H. AND HAMERS R. (1998) ;** Identification et caractérisation d'une protéine recombinante  $\beta$ -galactosidase/Est.R1 codant pour un antigène de sporozoïte d'*Eimeria stiedae* (coccidiose de lapin) Recherche Agronomique, 3, 19-44, I.N.R.A.A.

