

Utilisation des organoïdes intestinaux porcins pour l'étude du virus de la gastro-entérite transmissible

Maud Contrant ⁽¹⁾, Lionel Bigault ⁽¹⁾, Ludivine Percevault ⁽¹⁾, Camille Duschene ⁽²⁾, Frédéric Paboeuf ⁽³⁾, Daniel Dory ⁽¹⁾, Gaelle Boudry ⁽²⁾, Yannick Blanchard ⁽¹⁾

(1) ANSES, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité Génétique Virale et Biosécurité, B.P.53, 22440 Ploufragan, France.

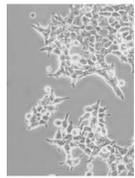
(2) Institut NuMeCan INRAE, INSERM, Université Rennes, Equipe Control of Eating Behaviors (EAT), 16 Le Clos, 35590 Saint-Gilles, France

(3) ANSES, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Service de production de porcs assainis et d'expérimentation, B.P.53, 22440 Ploufragan, France.

Introduction

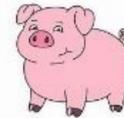
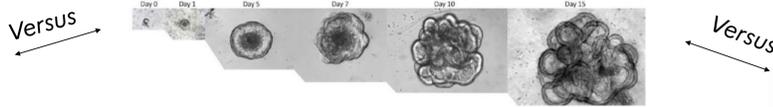
❖ORGANOIDES (Hans Clevers 2009)

-> Mini-organes qui possède les éléments clés de l'architecture et de la physiologie des organes cibles



❖CULTURE CELLULAIRE (In vitro)

- > Mime rarement la complexité des organes
- > Origine cancéreuse ou immortalisées
- > Adaptation du pathogène



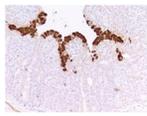
❖EXPERIMENTATION ANIMALE (In vivo)

- > Remise en cause de l'utilisation d'animaux
- > Expérimentations coûteuses
- > Recherche d'alternatives

-> Mise en place d'un système d'infection d'organoïdes entériques porcins pour l'étude des interactions hôtes/pathogène du vGET

❖ Modèle GETv : virus de la gastroentérite transmissible porcine

Nidovirales – Coronidovirineae – Coronaviridae – Orthocoronavirinae – α-CoV

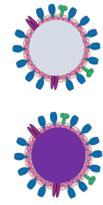


- Tractus gastro-intestinal (intestin grêle)
- > pAPN + co-récepteurs spécifiques
- Sites primaires d'infection: jéjunum, iléon et duodénum

- Diarrhée sévère liquide, vomissement, déshydratation, perte de poids, léthargie
- Jusqu'à 100% de mortalité chez les porcelets de 5 à 21 jours

❖ Infection par 2 souches de virulence variée et plus ou moins adaptées à la culture cellulaire

-> 2 génogroupes : Miller and Purdue



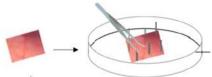
- Broyat de jejunum infecté
- Supernageant de cellules ST infectées (3 passages)

INFECTION

- Jéjunum
- Iléon
- Duodénum

REINFECTION
À partir d'infection 1

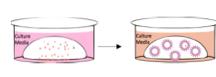
Matériel et méthode



Isolement des cellules souches

-> Porcs EOPS

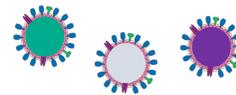
L'intestin de porcs EOPS (exempts d'organismes pathogènes spécifiés) de 10 semaines d'âge est découpé longitudinalement et repris dans du PBS/antibiotique/DTT, les villosités sont ensuite retirées par grattage. Cette étape est vérifiée au microscope. Les cryptes sont ensuite isolées avec une pince après 2 lavages dans du PBS/3m MDTT et 10uM de Rock inhibitor + antibiotiques puis filtrées à 200µ et reprises dans du DMEM F12 10% SVF froid. 150 cryptes sont cultivées en p24 dans un dôme 3D de Matrigel (50µl) polymérisé recouvert de milieu de culture DMEM F12 10% SVF (500µl). Passage tous les 8 jours environ.



Conditions de culture

-> Croissance et étalement 2D

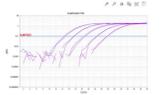
Pour l'étalement en 2D de cellules dissociées d'organoïdes 3D (passage 5), les puits p24 sont coâtés avec 500µl de DMEM-F12 (FROID) + 0.5% de matrigel et incubé 1 heure à 37°C. Les organoïdes sont dissociés et digérés avec 1ml de TryPLE, centrifugé 2 fois à 300G 4°C, 5 min et resuspendus dans 1mL de DMEM F12 10% SVF pour comptage. 400000 cellules sont culotées et reprises dans du milieu de différenciation (IntestiCult avec 1mL de milieu de base et 800ul de supplément avec antibiotique). Le milieu est retiré des puits et après séchage 10 minutes les cellules sont déposés sur le matrigel.



Tests d'infections

-> Production de virus

Des cellules 2D étalées 72h avant dans du milieu de différenciation (ratio du milieu IntestiCult milieu de base : milieu supplément 1:0,8) sont infectés avec 200µL de broyats de jejunum de porcs infectés ou de surnageants de cellules ST (swine testis), passage 3, des souches Miller et Purdue. Après 1h d'incubation à 37°C 5% CO₂, l'inoculum est retiré et les cellules sont lavées avec 500µL de milieu DMEM F12 sans SVF. Les cellules sont incubées pendant 72h à 37°C 5% CO₂.



Tests d'infections

-> Quantification du virus

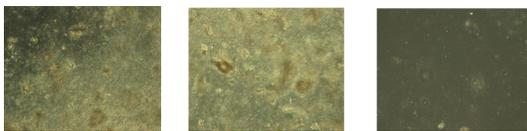
Le surnageant et les cellules sont extraits au Trizol. La présence de génome viral est testé par RT-qPCR TAQMAN dans 25µl final à partir du mastermix RT-PCR 1 step avec 5µl d'ADN et 300nM/L final d'amorce sens : GCAGGTAAGGTGATGTGACAA et antisens : ACATTCAGCCAGTTGGGGTAA et 200nM/L finale de sonde : 6 FAM TGG CAC TGC TGG GAT TGG CAA CGA MGB. Le mélange est incubé ensuite 30 minutes à 48°C, 10 minutes à 95°C et 40 cycles à 95°C 15 secondes et 60°C 1 minute.

Résultats

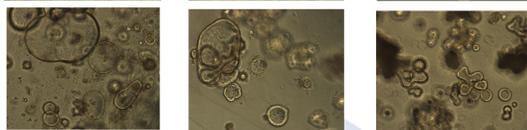
Production d'organoïdes

Duodénum Jéjunum Iléon

J1 après isolation
-> cryptes



J4 après isolation
-> sphéroïdes



J8 après isolation
-> organoïdes



Cellules 2D d'organoïdes de jéjunum dissociés



72 heures

(+) milieu de différenciation



Cellules 2D confluentes

Image: grossissement X10

Tests d'infection et de réinfection d'organoïdes avec le vGET

SURNAGEANT

Souche	Extrait	Quantification du gene N (copies/mL) par RT-qPCR								
		Jéjunum			Duodénum			Iléon		
		infection 1	infection 2	réinfection	infection 1	infection 2	réinfection	infection 1	infection 2	réinfection
Miller	T0 BR	1,22E+04	NT	NT	3,53E+03	NT	NT	5,97E+03	NT	NT
	72 hpi BR	5,53E+05	NT	NT	1,90E+05	NT	NT	2,85E+05	NT	NT
	T0 ST	1,03E+04	NT	NT	1,87E+04	NT	NT	2,14E+04	NT	NT
	72 hpi ST	2,28E+07	NT	NT	5,52E+06	NT	NT	1,87E+06	NT	NT
Purdue	T0 BR	-	-	-	-	-	-	-	-	NT
	72 BR	2,86E+03	-	3,81E+03	1,10E+04	-	6,71E+03	-	-	NT
	T0 ST	1,79E+06	4,95E+04	1,02E+07	6,20E+06	3,24E+04	NT	5,27E+06	2,37E+04	NT
	72 ST	2,16E+09	5,90E+05	3,41E+09	9,24E+06	1,52E+06	NT	6,78E+06	1,70E+06	NT

BR: broyat; ST: swine testis; NT: non testé; -: 0.E+00

CELLULES

Souche	Extrait	Quantification du gene N (ng ARN) par RT-qPCR								
		Jéjunum			Duodénum			Iléon		
		infection 1	infection 2	réinfection	infection 1	infection 2	réinfection	infection 1	infection 2	réinfection
Miller	72 hpi BR	1,56E+03	NT	NT	-	NT	NT	1,09E+02	NT	NT
	72 hpi ST	3,66E+03	NT	NT	1,38E+03	NT	NT	3,68E+02	NT	NT
Purdue	72 hpi BR	-	-	-	-	-	-	-	-	NT
	72 ST	4,59E+07	9,34E+02	8,76E+05	2,14E+03	2,00E+02	NT	8,73E+02	3,42E+02	NT

BR: broyat; ST: swine testis; NT: non testé; -: 0.E+00

Conclusions

- ❖ Nous avons pu développer avec succès des méthodes d'isolation et de production d'organoïdes entériques issus de plusieurs régions de l'intestin grêle de porcs (jéjunum, duodénum, iléon).
- ❖ Un protocole d'infection d'organoïdes dissociés en cellules 2D, par le virus de la GETv, a été optimisé, où les cellules 2D de jéjunum semblent être les plus permissives. Les infections à partir de virus isolés sur cellules ST semblent plus efficaces que les infections à partir de virus provenant de broyat. Des optimisations seront apportées.

-> Le modèle organoïde intestinale présenté ici va être développé et valorisé dans l'étude d'autres virus entériques porcins tel que le coronavirus porcine responsable de la diarrhée épidémique porcine (vDEP) ou les rotavirus, ces derniers sont responsables de la majorité des diarrhées néonatales porcines et circulants en France.

-> Dans le but de valider les organoïdes comme modèle alternatif aux conditions in vivo et in vitro et d'évaluer l'apport du modèle organoïde dans l'étude des interactions hôtes-pathogène, des analyse transcriptomiques comparatives seront initiées entre les 3 contexte d'expression (in vitro, in cellula, in vivo) et entre les 2 souches de GETv.

-> Enfin nous souhaitons mettre en place un système d'organoïdes pulmonaires pour étendre et approfondir notre analyse de la réponse hôte/pathogène de nos souches de GETv.