



# 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 DUCHESNE (3), Frédéric PABOEUF (2), Daniel DORY (1), Gaelle BOUDRY (3), Yannick BLANCHARD (1)

(1) ANSES, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité Génétique Virale et Biosécurité

(2) ANSES, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Service de Production de Porcs Assainis et d'Expérimentation

(3) Institut NuMeCan INRAE, INSERM, Université Rennes, Equipe Control of Eating Behaviors (EAT)

maud.contrant@anses.fr

Remerciements : Institut CARNOT AgriFoodTransition

## Use of porcine intestinal organoids to study the transmissible gastroenteritis virus

To date, host-virus interactions have been studied mainly in cell cultures and/or animal models. These approaches come up against two problems: i) methodological, usually related to using immortalized cell lines, which can differ greatly from the target cells of the virus, and ii) ethical, related to experimenting with animals, which can induce varying degrees of symptoms and cause suffering and death. The recent development of organoids has made it possible to develop *ex vivo* models whose experimental conditions are significantly closer to physiological conditions. Using organoids makes it possible to plan to decrease animal experimentation greatly, in line with the 3Rs principle (Reduction, Refinement, Replacement), and each animal can potentially produce thousands of organoids from different tissues. The Viral Genetics and Biosafety Unit applies the porcine organoid system developed locally as part of the PigOrg project (of INRAE, ANSES and INSERM, funded by the Carnot Agrifood Transition Institute) to models of enteric coronavirus in piglets, which has a strong impact on the pig industry. Here, we used the porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV) as a model, for which several strains of varying virulence exist and which can be cultivated on immortalized cells, to establish protocols of infections of different organoids (jejunum, duodenum, and ileum). Infections seem more effective for the jejunum than for the duodenum or ileum, and for viruses isolated on cells than on organ homogenate. This organoid system, which connects *in vitro* and *in vivo* conditions, will open novel and original perspectives into understanding the physiopathology of virus infections, especially deciphering host-pathogen interactions, without always needing to rely on extensive animal experiments.

## INTRODUCTION

La production et le maintien d'organoïdes intestinaux est une méthode initialement développée en 2009 à partir de prélèvements d'intestin chez la souris dans le laboratoire d'Hans Clevers aux Pays-Bas. Cette technique se base sur la récupération de cryptes intestinales contenant des cellules souches qui vont se différencier en différents constituants de l'épithélium intestinal (entérocytes, cellules de Paneth...) lors de la formation d'organoïdes. Elle a été depuis développée à partir de prélèvements intestinaux chez l'humain et chez de nombreux modèles animaux dont le porc. Le projet (PigOrg) a pour objectif la création d'une plateforme partagée d'organoïdes intestinaux et notre but est de les utiliser dans l'étude des relations hôte-pathogènes. Pour cela, nous avons appliqué une méthodologie de production de sphéroïdes et d'organoïdes à partir d'isolement et de culture de cryptes

intestinales provenant de jéjunum, d'iléon et de duodénum de porcs. Nous avons ensuite mis au point une méthodologie d'infection des organoïdes à partir d'un modèle de coronavirus entérique porcine, le vGET (virus de la gastro-entérite transmissible porcine). Ce virus, identifié en 1946, appartient au genre des alpha coronavirus, et est le premier des six coronavirus porcins recensés à ce jour. Il infecte l'intestin grêle par sa liaison au récepteur pAPN (amino peptidase N porcine) et provoque de sévères diarrhées pouvant provoquer jusqu'à 100 % de mortalité chez les porcelets de cinq à 21 jours d'âge. Au niveau phylogénétique, l'ensemble des souches de vGET est réparti en deux génogroupes : les souches Miller et les souches Purdue. Dans notre projet nous avons utilisés ces deux souches différentes, montrant des caractéristiques propres à chacune pour la réalisation de premiers tests d'infection.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Description des porcs pour l'obtention des organoïdes

Pour l'obtention des cryptes intestinales, l'intestin grêle d'un porc EOPS (exempt d'organisme pathogène spécifique), de type Large White, âgé de six semaines, a été prélevé lors d'une autopsie.

### 1.2. Préparation des organoïdes

#### 1.2.1. Isolement des cryptes

L'intestin grêle (jéjunum, duodénum et iléon) est découpé longitudinalement et repris dans du Phosphate-buffered saline (PBS)/antibiotique/dithiothréitol (DTT) les villosités sont ensuite retirées par grattage. Cette étape est vérifiée au microscope. Les cryptes sont ensuite dissociées et isolées avec une pince après deux lavages dans du PBS/3mM DTT et 10 micromolaire de Rock inhibitor + antibiotiques puis filtrées à 200 microns et reprises dans du DMEM F12 10 % SVF froid. Les cryptes sont cultivées immédiatement ou congelées pour usage ultérieur.

#### 1.2.2. Culture tridimensionnelle des cryptes et des organoïdes

Cent cinquante cryptes sont cultivées en p24 dans un dôme 3D de matrigel (50 µl) polymérisé recouvert de milieu de culture DMEM F12 10 % SVF (500µl). Après huit jours nous pouvons observer la formation de sphéroïdes et d'organoïdes. Les organoïdes sont dissociés et ré-étalés tous les huit jours.

#### 1.2.3. Etalement en 2D et différenciation cellulaire

Pour l'étalement en 2D, les puits p24 sont couverts avec 500 µl de DMEM-F12 (FROID) + 0,5 % de matrigel et incubés 1 heure à 37°C. Les organoïdes sont dissociés et digérés avec 1 ml de TryPLE, centrifugé 2 fois à 300G 4°C, 5 min et resuspendus dans 1 ml de DMEM F12 10 % SVF pour comptage. Quatre cent mille cellules sont culotées et reprises dans du milieu de différenciation (IntestiCult avec 1 ml de milieu de base et 800 µl de supplément avec antibiotique). Le milieu de coating est retiré des puits et après séchage 10 minutes les cellules sont déposées sur le matrigel.

### 1.3. Tests d'infections

#### 1.3.1. Production des virus

Les différents virus (Miller et Purdue, respectivement) sont obtenus soit à partir de broyat de jéjunum infectés (7,33E+07 et 3,4E+06 copies de génome/ml) soit par 3 passages successifs de virus sur les cellules ST (Swine Testis) de porcs (1,32E+09 et 4,4E+10 copies de génome/ml).

#### 1.3.2. Infections des organoïdes par le GETv

Soixante-douze heures avant infection, les organoïdes 3D (passage 5) sont dissociés en cellules 2D qui sont étalées dans du milieu de différenciation (ratio du milieu IntestiCult milieu de base : milieu supplément 1:0,8). Les cellules confluentes sont ensuite infectées avec 200 µl de broyats de jéjunum de porcs infectés ou de surnageants de cellules ST des souches Miller et Purdue. Après 1h d'incubation à 37°C 5 % CO<sub>2</sub>, l'inoculum est retiré et les cellules sont lavées avec 500 µl de milieu DMEM F12 sans SVF. Un T0 est prélevé et les cellules sont incubées pendant 72h à 37°C 5 % CO<sub>2</sub>.

#### 1.3.3. Quantification du génome viral du GETv

Le surnageant et les cellules sont extraits au Trizol. La présence de génome viral est testée par RT-qPCR TAQMAN dans 25 µl

final à partir du mastermix RT-PCR 1 step avec 5 µl d'ADN et 300 nM/L final d'amorce sens : GCAGGTAAGGTGATGTGA-CAA et antisens : ACATTCAGCCAGTTGTGGGTAA et 200 nM/L finale de sonde : 6 FAM TGG CAC TGC TGG GAT TGG CAA CGA MGB. Le mix 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.

## 2. RESULTATS

### 2.1. Obtention d'organoïdes intestinaux porcins

Après 8 jours de culture dans du matrigel, suite à l'isolation des cryptes, la formation d'organoïdes est détectée au microscope (Figure 1).

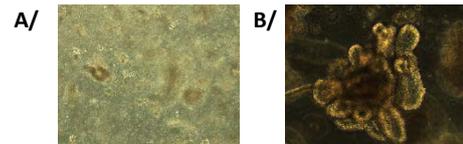


Figure 1 – A/cryptes de jéjunum jour 1 post isolation. B/ formation d'organoïde jour 8 post isolation. Grossissement x10

### 2.2. Tests d'infections d'organoïdes intestinaux par le vGET

Les résultats de l'infection des différents organoïdes par les deux souches de vGET (Miller et Purdue) sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 – Quantification du gène N du vGET par RT-qPCR en copie de génome/ml dans le surnageant d'infection à T0 et après 72h d'infection

Souche	Extrait	Copie de génome/mL		
		Jéjunum	Iléon	Duodénum
Miller	T0 Br	1.93E+05	-	-
	72 h Br	1.87E+05	-	-
	T0 ST	1.93E+05	5.04E+04	-
	72 h ST	1.87E+05	1.75E+05	-
Purdue	T0 Br	-	-	-
	72 h Br	2.86E+03	-	1.10E+04
	T0 ST	1.79E+06	5.27E+06	6.20E+06
	72 h ST	2.16E+09	6.78E+06	9.24E+06

Br : broyat, ST : surnageant de cellules ST, - : 0<sup>E</sup>+00

## CONCLUSION

Sur un animal, nous avons pu développer avec succès des méthodes d'isolation et de production d'organoïdes entériques provenant de plusieurs régions de l'intestin grêle de porcs (jéjunum, duodénum, iléon), et déterminer des conditions d'étalement en 2D des organoïdes produits. Des tests de différenciations des cellules souches provenant des cryptes en cellules de type entérocytes et cellules de Paneth (constituants de l'intestin grêle et cibles du vGET) par RT-qPCR sont en cours.

Un protocole d'infection d'organoïdes en cellules 2D par le virus de la GET a été mis en place ; les infections semblent plus efficaces pour le jéjunum comparé au duodénum et iléon tout comme de virus isolés sur cellules ST comparé au virus provenant de broyat.

Le modèle organoïde entérique porcin, à l'interface de l'in vitro et de l'in vivo, permettra l'étude des interactions hôtes-pathogènes des coronaviruses mais aussi d'autres pathogènes entériques porcin.