



HAL
open science

Génération d'organoïdes respiratoires à exposition extérieure apicale à partir de cellules de pools de donneurs

Elodie Alessandri-Gradt, Samuel Constant, Jean-Christophe Plantier, Georgios Stroulios, Salvatore Simmini, Caroline Tapparel

► **To cite this version:**

Elodie Alessandri-Gradt, Samuel Constant, Jean-Christophe Plantier, Georgios Stroulios, Salvatore Simmini, et al.. Génération d'organoïdes respiratoires à exposition extérieure apicale à partir de cellules de pools de donneurs. Journées francophones de virologie, Apr 2023, Paris, France. hal-04276932

HAL Id: hal-04276932

<https://hal.science/hal-04276932v1>

Submitted on 9 Nov 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.

À PARTIR DE CELLULES NASALES DE POOLS DE DONNEURS

Elodie Alessandri-Gradt¹, Samuel Constant², Jean-Christophe Plantier¹, Georgios Stroulios³, Salvatore Simmini³ and Caroline Tapparel⁴

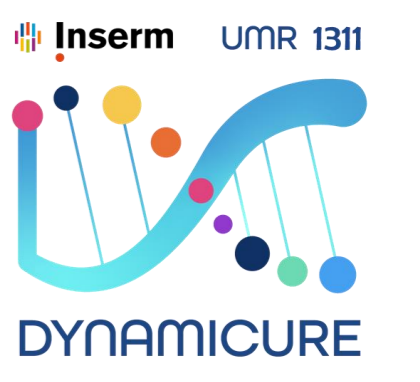


¹ Univ Rouen Normandie, INSERM UMR1311, DYNAMICURE, CHU hôpitaux de Rouen Normandie, 76 000 Rouen, France

² Epithelix SAS, Genève, Suisse

³ STEMCELL Technologies UK Ltd., Cambridge, Royaume-Uni

⁴ Département de Microbiologie et Médecine moléculaire, Université de Genève, 1206 Genève, Suisse



Introduction

Les infections virales respiratoires représentent la majorité des motifs de consultation en soins primaires^{1,2}, générant un problème de santé publique préoccupant. L'étude *in vitro* des principaux virus à l'origine de ces infections tels que le virus respiratoire syncytial (VRS) et les rhinovirus (RV), doit rendre compte de la complexité de l'environnement respiratoire. Ainsi, les modèles d'étude tissulaire en système Air-liquide et les organoïdes respiratoires remplacent progressivement les cultures cellulaires en lignées 2D. Pour autant, certains de ces systèmes complexes sont difficilement transposables pour des applications à large échelle (screening de drogues, études pharmacotoxicologiques...)

Objectifs

→ Générer un modèle d'organoïdes respiratoires avec exposition extérieure apicale à partir d'un pool de cellules primaires nasales et fixer les conditions optimales d'agrégation

→ Tester les conditions d'infection par VRS et RV (RV-C15, pour lequel les modèles cellulaires sont actuellement limités)

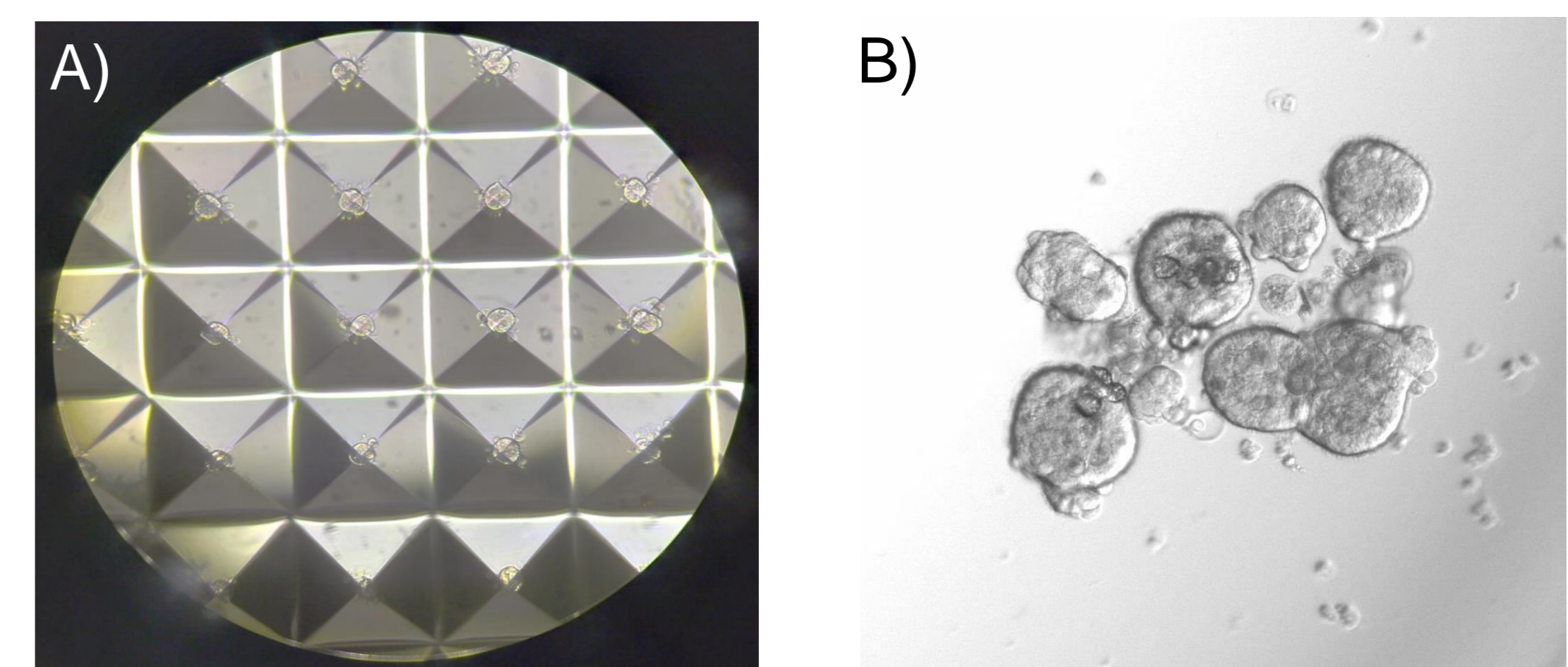
Méthodes

Production des organoïdes:

Des cellules de l'épithélium nasal d'un pool de 14 donneurs produits par la société Epithelix ont été cultivées en T75 (milieu hAEC, Epithelix) 37°C 5% CO₂. A confluence, 1.2x10⁵ cellules ont été déposées dans chaque puit d'une plaque Aggrewell™400-24w (Stemcell) en milieu Pneumacult™ apical-out airway organoid (AOAO Stemcell)³. Les agrégats obtenus ont été transférés en plaque de culture 24 puits pour maturation avec renouvellement de 50% du milieu tous les 3 jours jusqu'à J15.

Conditions d'infection:

Les organoïdes matures ont été filtrés (reversible strainer 37µm, Stemcell) et infectés par un VRS-A marqué en fluorescence rouge (mcherry) (0.02 MOI) et un RV-C15 (0.2 MOI) en milieu Pneumacult™ AOA0³, et transférés en plaque 96 puits dans un volume final de 100µl. A J2 et J3, 50µl de surnageant ont été extraits (EasyMag Biomerieux) et le nombre de copies de génome viraux a été quantifié par real-time RT-PCR en présence de standards de références^{4,5}.



A) Agrégats générés après 2 jours en plaque Aggrewell™400 (Microscopie optique x40)
B) Organoïdes obtenus après 15 jours de maturation (Microscopie optique X100)

Caractéristiques des souches virales utilisées

	VRS-A mcherry	RV-C15
Lignées de production	A549	Hela e8
TCID50/ml	2.81x10 ⁶	1.58x10 ⁵

Résultats

Les conditions d'agrégation pour le pool de cellules utilisées sont optimales pour 4 jours d'agrégation, sans filtration

Le nombre moyen d'organoïdes générés par plaque 24 puits était de 3090, avec observation de battements ciliaires dès J11, attestant de la présentation apicale extérieure des cellules épithéliales. L'observation des organoïdes produits à J7, J10 et J14 montrait une production optimale en nombre moyen d'organoïdes/puits (max 261 à J10) et sans phénomène de fusion après 4 jours en Aggrewell™400 (Figure 1).

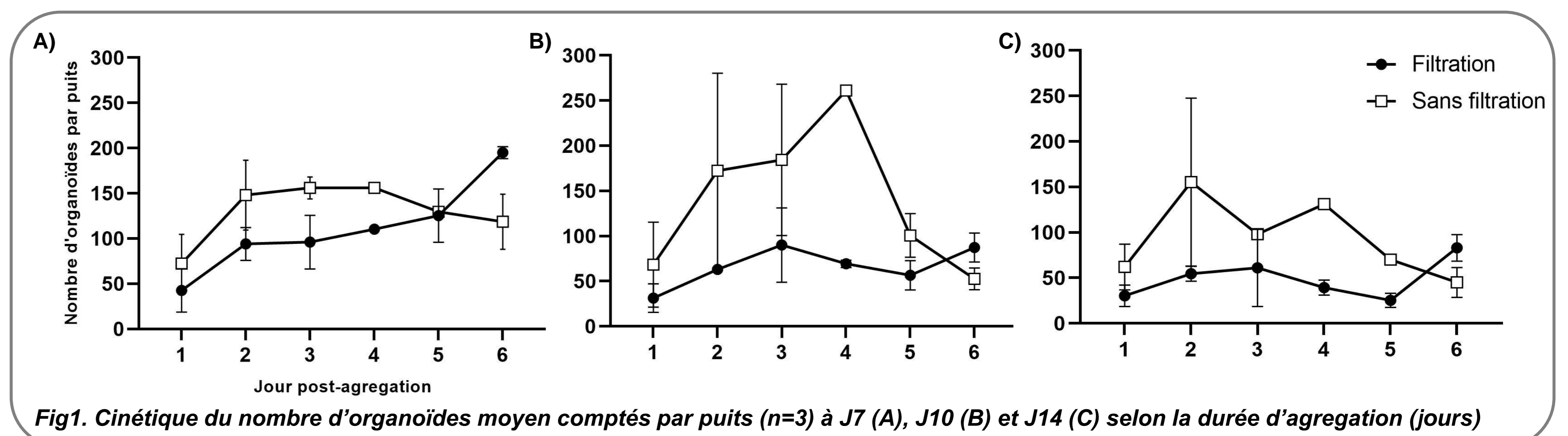


Fig1. Cinétique du nombre d'organoïdes moyen comptés par puits (n=3) à J7 (A), J10 (B) et J14 (C) selon la durée d'agrégation (jours)

Les organoïdes supportent une infection par le VRS-A et le RV-C avec élévation du titre viral sur 3 jours

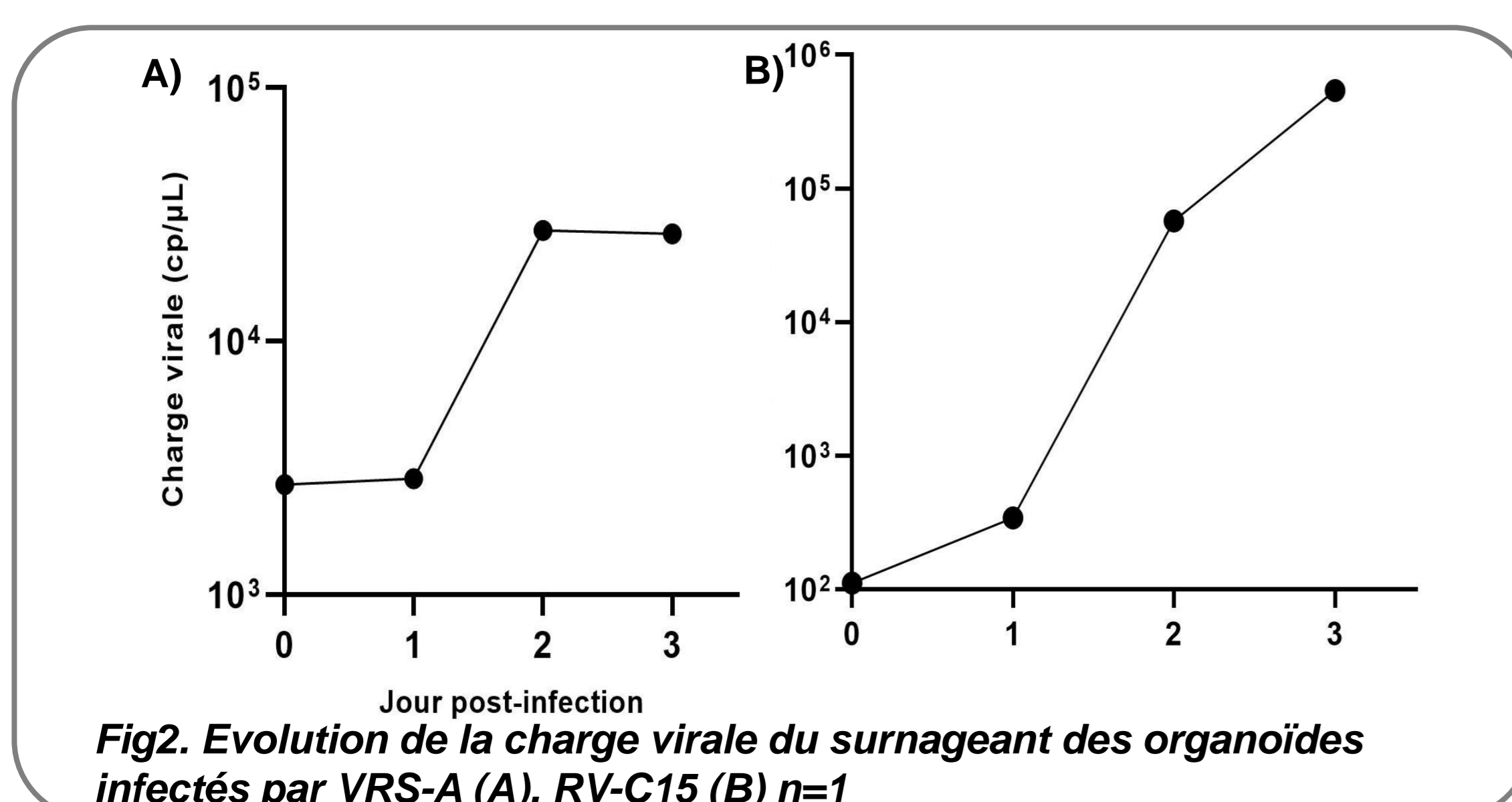


Fig2. Evolution de la charge virale du surnageant des organoïdes infectés par VRS-A (A), RV-C15 (B) n=1

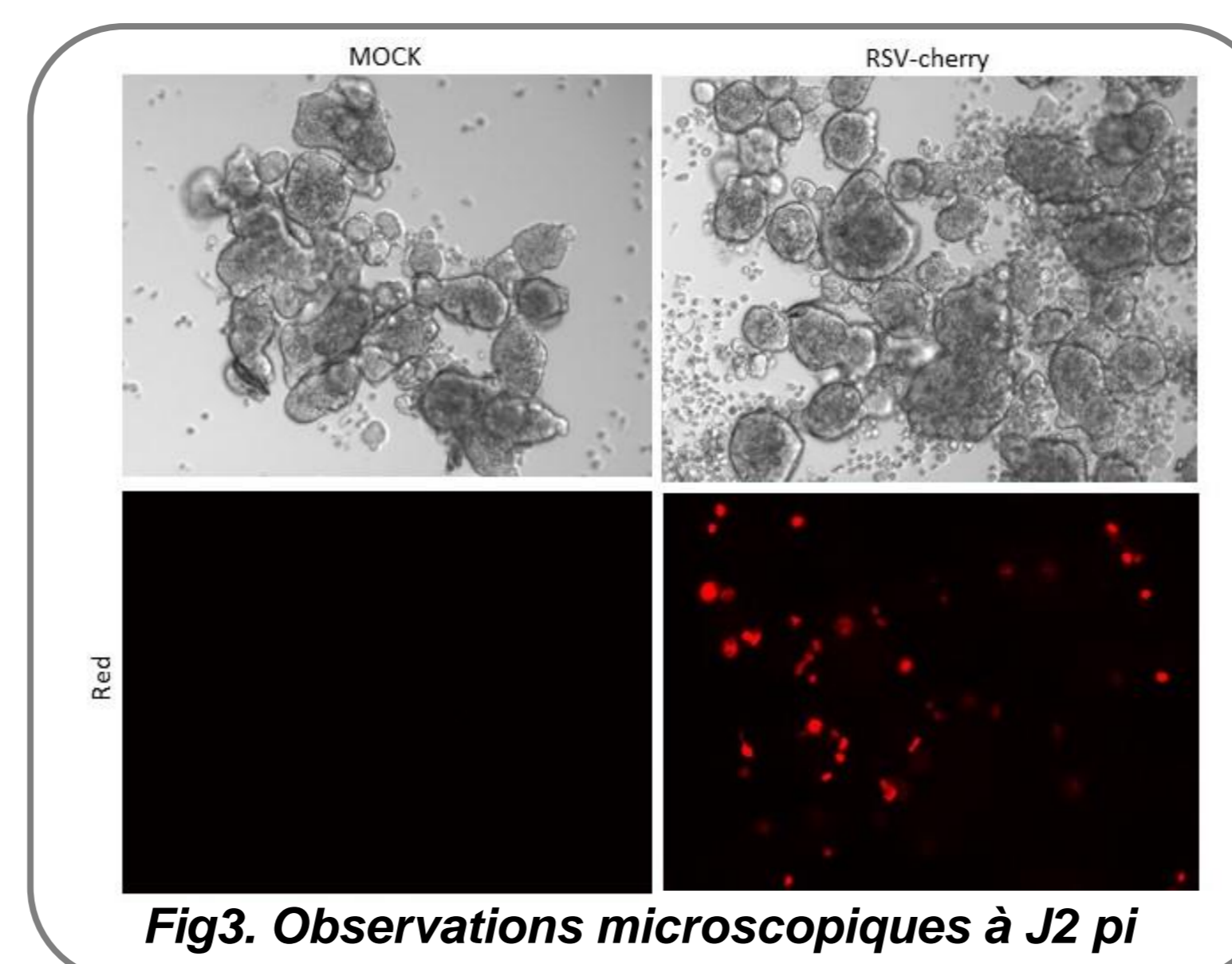


Fig3. Observations microscopiques à J2 pi

Après transfert des organoïdes matures en plaque 96 puits, l'infection par le VRS-A mcherry a produit un titre de 4.4 Log RNA cp/µL à 48h post-infection (pi) et stable à 72h (Figure 2.A). Les observations microscopiques montraient également une fluorescence des organoïdes infectés dès J2 pi (Figure 3).

Pour le RV-C15, le titre viral obtenu à 72h pi était de 5.7 Log RNA cp/µL avec un gain de plus de 2 Log entre le 1er et le 3ème jour pi (Figure 2.B).

Conclusions

Ces résultats montrent la faisabilité de la production d'organoïdes respiratoires de polarisation inversée et permissifs au VRS-A et RV-C en format utilisable pour des criblages à haut débit. Une standardisation de la reproductibilité et une dose-réponse de la réplication du VRS en présence de doses croissantes de ribavirine sont en cours. Ces données ouvrent la porte à des perspectives innovantes pour l'étude de ces virus d'impact majeur et pour lesquels aucun traitement efficace n'est encore disponible.

Références

- Jin et al. *eClinicalMedicine* 2021 Jul 37:100986
- Liu et al. *Viruses* 2022 Nov 18;14(11):2550
- Stroulios et al. *Scientific Report* 2022 12:7673
- Essaidi-Laziosi et al. *J virol method* 2016 Sep;235:9-14
- Essaidi-Laziosi et al. *J Allergy Clin Immunol.* 2018 Jun;141(6):2074-2084