

EN DIRECT DU LABO

Organoïdes intestinaux porcins : vers de nouveaux types d'essais pour les produits à cible digestive

« Notre objectif est de maîtriser ces modèles de tissus créés in vitro que sont les organoïdes intestinaux, pour mettre à disposition de nos clients des études d'efficacité d'additifs ou de translocation de molécules », indique d'emblée la Dr^e Vét. Mouna Abed, directrice santé animale de Labocéa. L'espèce cible est ici le porc et cette production d'organoïdes est en fin de développement à Labocéa-Ploufragan. Ce modèle a été réalisé à partir de cellules souches prélevées dans les cryptes intestinales de porcelets EOPS de la station de l'Anses de Ploufragan-Plouzané. C'est une plateforme de choix car il n'existe pas chez le porc de lignées cellulaires récapitulant l'ensemble des segments intestinaux : les organoïdes permettent donc d'avoir une approche plus fidèle à la physiologie de l'espèce.

L'objectif est de disposer d'un modèle de tissu tridimensionnel. Aussi, un travail exploratoire a été conduit à Labocéa-Ploufragan, dans le cadre d'un stage de licence de l'Université de Bretagne occidentale et de l'IUT de Brest-Morlaix, pour le développement d'une culture cellulaire tridimensionnelle (culture d'organoïdes). Les organoïdes présentent la difficulté de rassembler plusieurs types cellulaires, et donc d'obtenir dans la culture en 3D la différenciation de plusieurs composants tissulaires à partir des cellules souches de départ. Pour les organoïdes de l'intestin, une difficulté supplémentaire est leur aspect cavitaire : bien qu'il y ait une lumière (stérile dans la culture), il ne faut pas que l'épaisseur du tissu de paroi soit trop importante – sinon ce tissu risque d'évoluer en nécrose (défaut de perfusion en oxygène et nutriments depuis le milieu de culture).

Après la collecte des cellules souches sur les intestins de porcelets EOPS de la station, leur mise en culture vise la prolifération, puis la différenciation. Cela se fait dans du milieu de culture approprié (facteurs de croissance cellulaire, de différenciation, d'inhibition de l'apoptose, etc.), mais aussi à l'intérieur d'une matrice extracellulaire artificielle (le Matrigel®). Au terme de plusieurs mois de travail, d'essais et d'échecs, cette étude a permis de produire avec succès des organoïdes à partir de cellules souches prélevées dans le duodénum et dans le jéjunum de porcelets.

La preuve de principe de la maîtrise de cette technique a été stoppée après 13 et 17 semaines de survie pour le duodénum et le jéjunum respectivement, du fait des coûts du milieu de culture. Toutefois, si les besoins d'une étude l'exigent, ils peuvent être conservés en culture pendant plusieurs mois. Ces modèles présentent des similitudes avec l'organe d'origine. Par exemple, les villosités des entérocytes sont plus développées pour le jéjunum que pour le duodénum.

« Une caractérisation complète des organoïdes est en cours », précise Ana Cepeda Hontecillas, ingénieure biologiste à Labocéa-Ploufragan, qui a participé à ces travaux. Les organoïdes produits dans cette étude « sont théoriquement assez matures pour commencer des études de pathogènes (mise en place de modèles infectieux), comme ceux impliqués dans les troubles digestifs du porc ».



Organoïde intestinal sain obtenu après 3 jours de culture tridimensionnelle. Cliché réalisé au microscope optique inversé, grossissement x100 (© Labocéa).

UN CHIFFRE, DES ANALYSES

– 61,6 %

En 2024, Labocéa a effectué presque 62 % de moins de qRT-PCR sur des suspicions d'influenza aviaire hautement pathogène dans la faune sauvage, par rapport à 2023. Ce n'est pas un indicateur précis, mais il participe d'un faisceau d'arguments indiquant une accalmie (possiblement temporaire) de la panzootie à virus H5 du clade 2.3.4.4b dans l'avifaune.

ÇA BOUGE À LABOCÉA

Labocéa produit deux matériaux de référence pour le diagnostic de la paratuberculose par PCR

La paratuberculose (dite aussi maladie de Johne) est une maladie chronique incurable à l'origine de pertes économiques conséquentes, qui touche principalement les ruminants et dont l'agent causal est une mycobactérie : *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP). La croissance lente de ce pathogène complique sa détection en bactériologie (6 semaines de délai), rendant le recours à la PCR indispensable dans le cadre d'un diagnostic rapide et de la lutte active contre cette maladie.

Dans ce contexte, Labocéa a mis au point deux réactifs lyophilisés contenant cette mycobactérie :

- un matériau de référence au seuil d'interprétation (MRSI),
- un matériau de référence interne (MRI).

Ils ont été produits en ensemençant 25 g de fèces issues de bovins confirmés non infectés avec des quantités connues de MAP issues de culture. Ces échantillons ont ensuite été lyophilisés afin de faciliter leur stockage à température ambiante. Leur conservation se fait dans un endroit sec et à l'abri de la lumière. Ils ont actuellement une durée d'utilisation validée d'un an. Leur reconstitution, après ajout de 25 ml d'eau de qualité biologie moléculaire, permet la réalisation de quatre extractions (sur la base d'une prise d'essai de 5 g), correspondant à quatre séries d'analyses. Une fois reconstitué, le flacon conservé à + 4 °C est réutilisable durant un mois.

Ces deux matériaux aux concentrations différentes en MAP permettent d'une part, de faciliter le traitement des résultats d'analyses (MRSI), mais aussi leur validation (MRI). En effet, MAP étant un germe ubiquiste qui résiste dans l'environnement, il peut se trouver sur les aliments ingérés par les ruminants et être détecté dans les fèces grâce à la sensibilité de la PCR. Le MRSI a été développé afin de pouvoir distinguer les excréteurs passifs (sujets positifs en lien avec le transit alimentaire de la bactérie) des forts excréteurs (bovins infectés).

Ce seuil de contamination des animaux, correspondant à la charge en pathogène du MRSI, a été établi à 10⁴ MAP/gramme de fèces*. Son utilisation dans chaque série d'analyses PCR permet d'apporter une réponse rapide pour différencier les animaux en fonction de leur niveau d'excrétion. La mise en place d'une PCR relative au MRSI permet de se soustraire de la quantification des échantillons et de simplifier le traitement des résultats. Cela permet d'aider dans la prise de décision quant au statut infectieux des bovins dont les prélèvements de fèces sont analysés.

Le MRI, matériau de référence interne, a été développé pour être utilisé comme sentinelle lors de la réalisation d'analyse PCR par les laboratoires d'analyse. Pour cela, sa charge a été définie pour être comprise entre 1 et 100 fois la limite de détection de la méthode PCR, conformément à la norme NF U47-600-1. Ce MRI peut être introduit dans chaque série d'analyses afin de subir le même traitement que les échantillons à tester et, ainsi, permettre de valider l'extraction et l'amplification de la cible. Il permettra également d'évaluer la fidélité de la méthode PCR MAP via une carte de contrôle au sein du laboratoire. Ce MRI peut aussi permettre de valider de nouveaux lots de réactifs, et de maintenir l'habilitation du personnel.

Un des deux matériaux de référence mis au point à Labocéa pour le diagnostic rapide de l'excrétion fécale de Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (© Labocéa).



* Kralik P. et al. *Evidence of passive faecal shedding of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in a Limousin cattle herd. Vet J., 2014;201(1):91-94.*

EN BREF

● **AFMVP** : Les D^{res} Amenna-Bernard, Labrut et Zacharopoulou (histologie) et le D^r Fellag (microbiologie) de Labocéa-Ploufragan sont co-auteurs d'un cas clinique présenté aux journées annuelles de l'Association française de médecine vétérinaire porcine, en décembre 2024. Il s'agit d'un carcinome mammaire sur deux truies adultes de race Yucatan (élevage de l'Inrae de Saint-Gilles), qui présentaient de nombreux nodules mammaires. L'histopathologie représente la seule technique sensible et spécifique permettant d'établir un diagnostic de certitude sur de telles lésions. Les D^{res} Mouna Abed (Labocéa) et Valérie Normand (Porc.Spective) ont aussi présenté un cas clinique sur l'intérêt du séquençage intégral du génome d'une souche d'*E. coli* dans le diagnostic de diarrhée en post-sevrage.

● **JRP** : Les données de séroprévalence de l'influenza porcine en France sur la période 2008-2022 ont été présentées à la 57^e édition des journées de la recherche porcine, à Saint-Malo, le 5 février 2025. Dans leur manuscrit, les auteurs, pour l'essentiel de l'Anses Ploufragan-Plouzané, ont remercié « Labocéa 22 pour la mise en œuvre des analyses de l'enquête de 2022 ».

● **USA** : Les équipes américaines de Virbac ont présenté un poster résumant les résultats d'une étude menée en commun avec Labocéa, au *Veterinary Dental Forum* qui se tenait du 25 au 28 septembre dernier en Californie. L'étude portait sur la sensibilité des bactéries anaérobies aux antimicrobiens, provenant de chiens atteints d'infections bucco-dentaires. Ce congrès constitue la plus grande conférence dentaire vétérinaire aux États-Unis.