



**HAL**  
open science

## Développement d'un modèle de cellules épithéliales de palais mou dorsal porcin sensible à l'infection par le virus de la fièvre aphteuse

Morgan Sarry, Cindy Bernelin Cottet, Caroline Michaud, Anthony Relmy, Aurore Romey, Anne-Laure Salomez, Hélène Huet, Grégory Jouvion, Sara Hägglund, Jean François Valarcher, et al.

### ► To cite this version:

Morgan Sarry, Cindy Bernelin Cottet, Caroline Michaud, Anthony Relmy, Aurore Romey, et al.. Développement d'un modèle de cellules épithéliales de palais mou dorsal porcin sensible à l'infection par le virus de la fièvre aphteuse. XXVèmes Journées Francophones de Virologie, Apr 2023, Paris, France. 2023. anses-04426223

**HAL Id: anses-04426223**

<https://anses.hal.science/anses-04426223v1>

Submitted on 30 Jan 2024

**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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Morgan Sarry<sup>1,2</sup>, Cindy Bernelin-Cottet<sup>1</sup>, Caroline Michaud<sup>1</sup>, Anthony Relmy<sup>1</sup>, Aurore Romey<sup>1</sup>, Anne-Laure Salomez<sup>1</sup>, Hélène Huet<sup>1</sup>, Gregory Jouvion<sup>3</sup>, Sara Hägglund<sup>4</sup>, Jean-François Valarcher<sup>4</sup>, Labib Bakkali Kassimi<sup>1</sup> and Sandra Blaise-Boisseau<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UMR VIROLOGIE, INRAE, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, ANSES Laboratoire de Santé Animale, Université Paris-Est, 94700 Maisons-Alfort, France.

<sup>2</sup> Ecole doctorale ABIES – AgroParisTech – 16 Rue Claude Bernard, 75005 Paris, France

<sup>3</sup> Unité d'Histologie et d'Anatomie pathologique, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, 94700, Maisons-Alfort, France

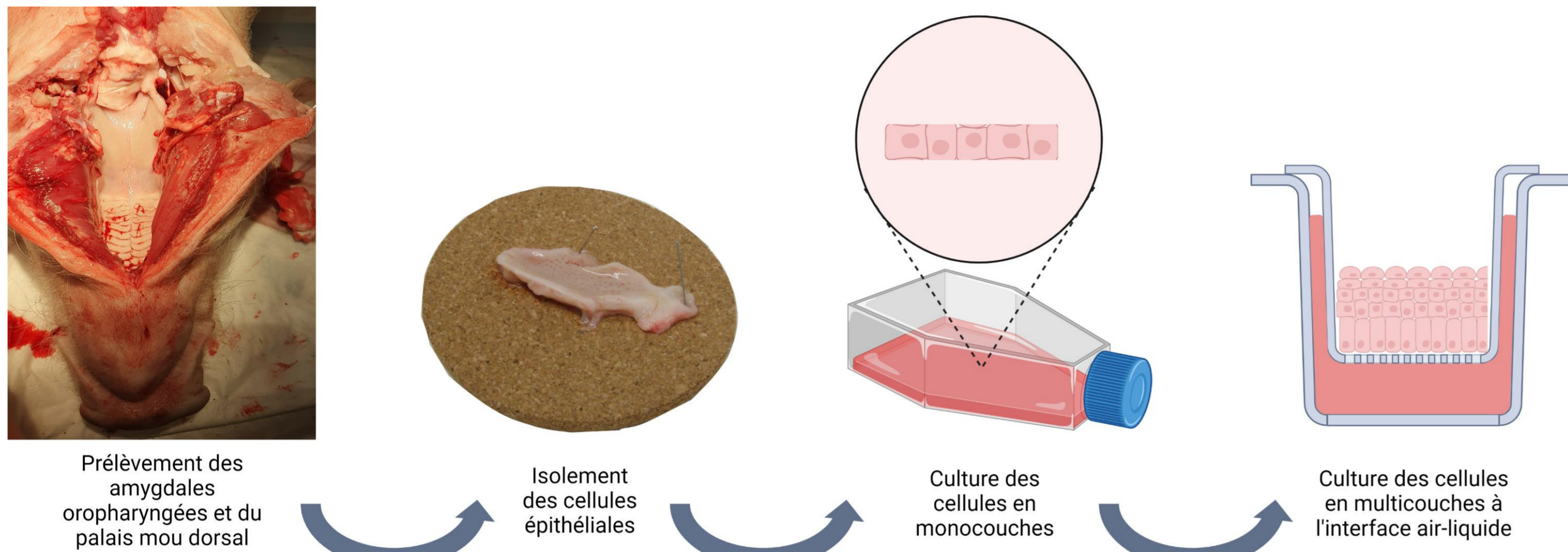
<sup>4</sup> Host Pathogen Interaction Group, Section of Ruminant Medicine, Department of Clinical Science, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Uppsala, Sweden

Correspondance : morgan.sarry@anses.fr

## INTRODUCTION & OBJECTIF

- La fièvre aphteuse (FA) est une maladie virale contagieuse causée par un picornavirus du genre *Aphthovirus* et affectant les *Artiodactyles* sauvages et domestiques.
- Le virus de la FA est capable de persister (*i.e.* virus infectieux détecté après 28 jours post-infection (dpi)) plusieurs années dans l'épithélium pharyngé des ruminants après résolution des signes cliniques<sup>1</sup>. Ce n'est pas le cas des porcins chez qui seuls des ARN viraux ont pu être détectés *in vivo* plus de 60 dpi dans les amygdales oropharyngées et le palais mou dorsal<sup>2,3</sup>.
- Aucun modèle cellulaire porcine provenant d'un tissu d'intérêt, cible de l'infection par le virus de la FA, n'est aujourd'hui disponible.

➤ **Objectif :** Développer un modèle cellulaire spécifique permettant d'étudier l'infection par le virus de la FA chez le porc.



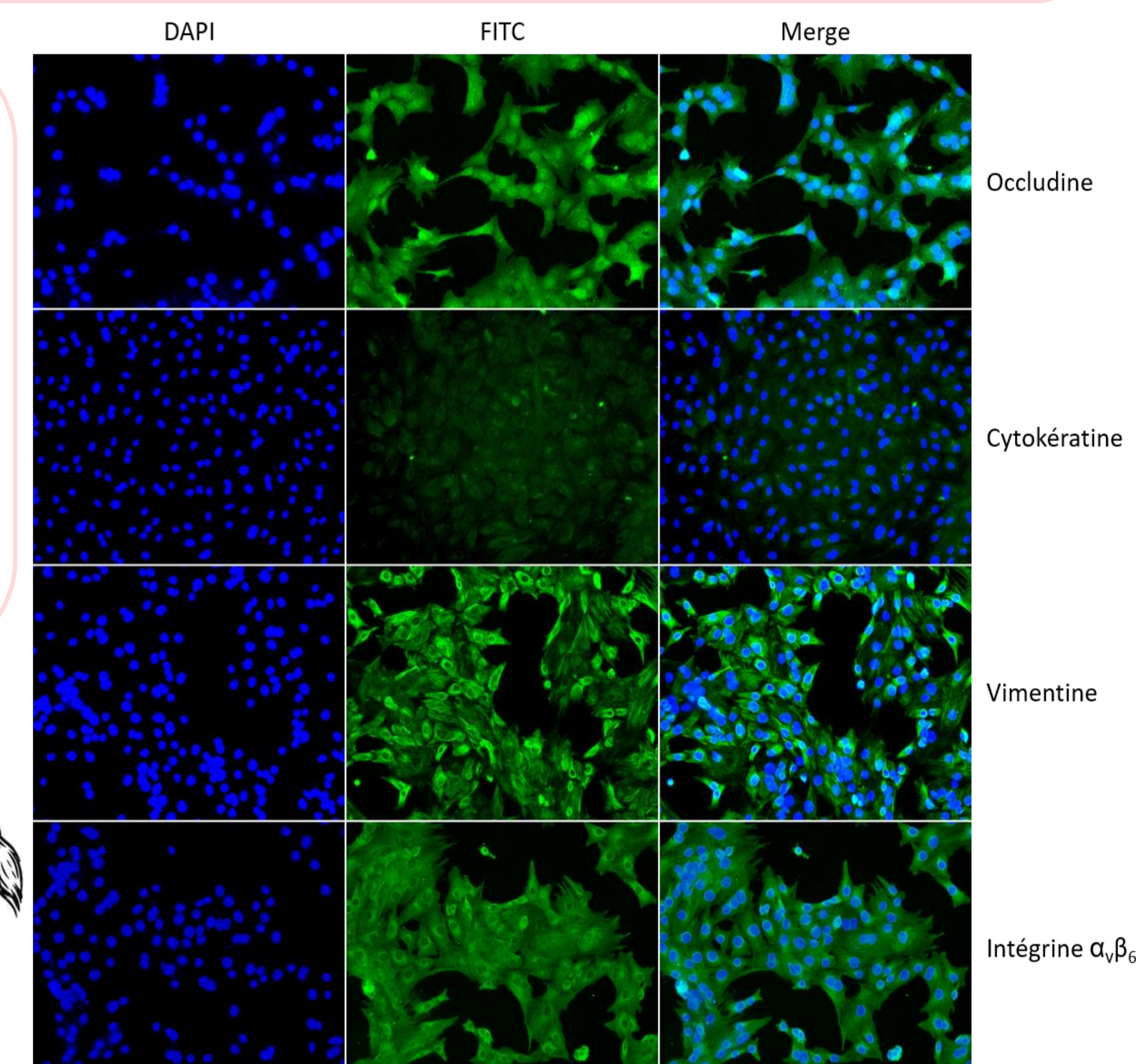
## Méthodologie

- Les amygdales oropharyngées et le palais mou dorsal de jeunes porcs ont été prélevés.
- Les tissus épithéliaux ont été identifiés puis isolés ①.
- Les cellules épithéliales provenant des prélèvements de palais mou dorsal (DSP) ont été mises en culture en monocouches, caractérisées ② puis infectées par le FMDV ③.
- Ces cellules ont ensuite été cultivées en multicouches à l'interface air-liquide afin de recréer un épithélium pluristratifié, puis infectées par le FMDV ④.

## ② Caractérisation des cellules DSP

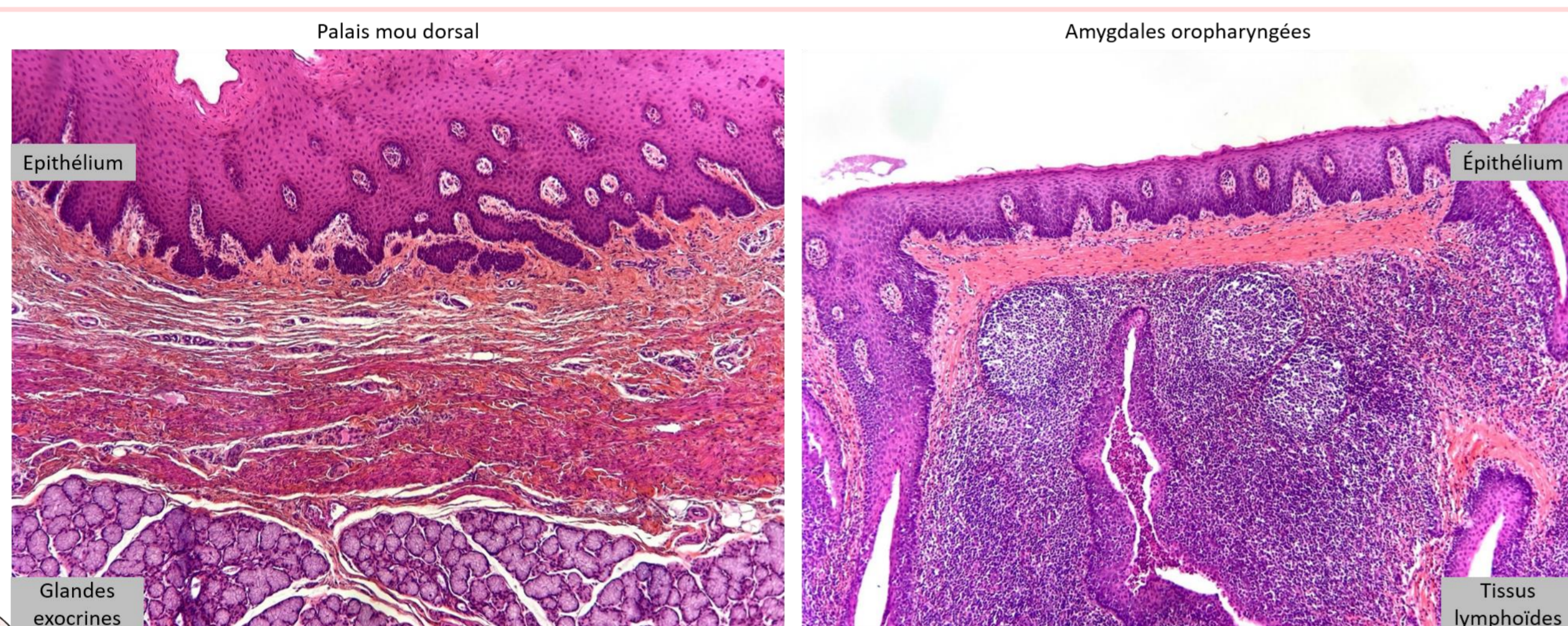
- Les cellules DSP ont été cultivées en monocouches, fixées puis marquées à l'aide d'anticorps dirigés contre des marqueurs épithéliaux (occludine, cytokératine) et fibroblastiques (vimentine), ainsi qu'un anticorps dirigé contre le récepteur du virus de la FA (intégrine  $\alpha_v\beta_6$ )

- Détection d'une expression importante d'occludine, signe d'une nature épithéliale.
- Détection d'une expression plus importante de vimentine que de cytokératine, signe d'une transition épithélio-mésenchymateuse.
- Détection d'une expression importante du récepteur principal du virus de la FA.



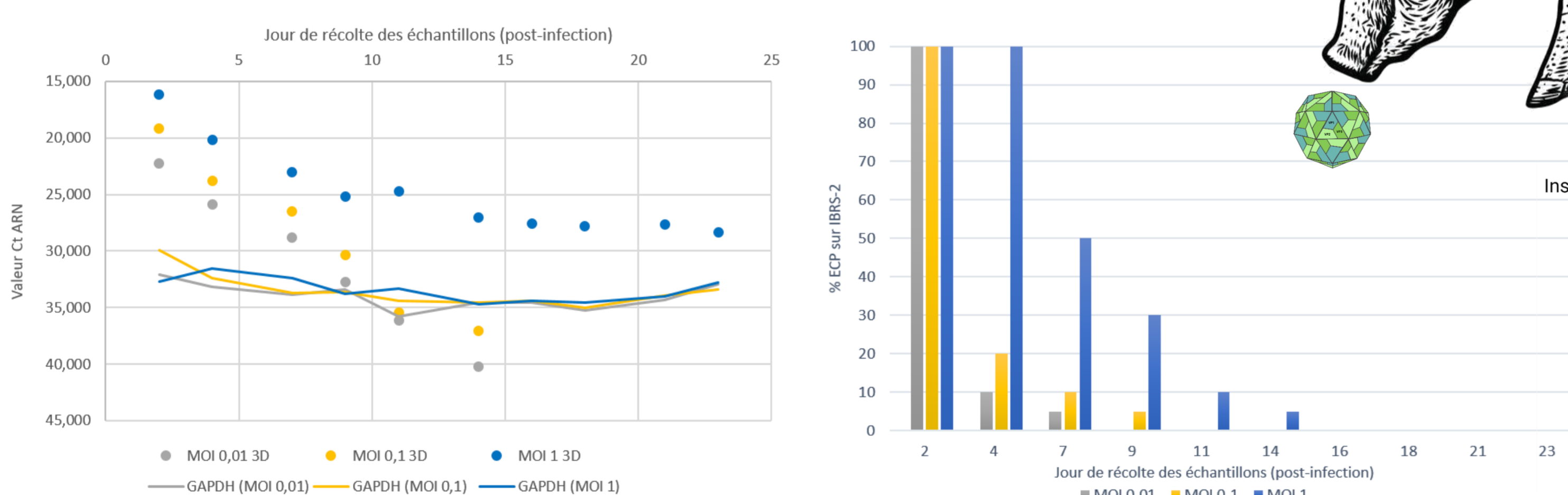
## ① Caractérisation des structures épithéliales

- Les prélèvements d'amygdales oropharyngées et de palais mou dorsal réalisés ont été caractérisés par marquage HES (Hémalum-Eosine-Safran) afin de vérifier la présence d'épithéliums.
- Des structures épithéliales ont pu être identifiées à la fois dans les prélèvements d'amygdales oropharyngées et de DSP.



## ③ Infection des DSP en monocouches

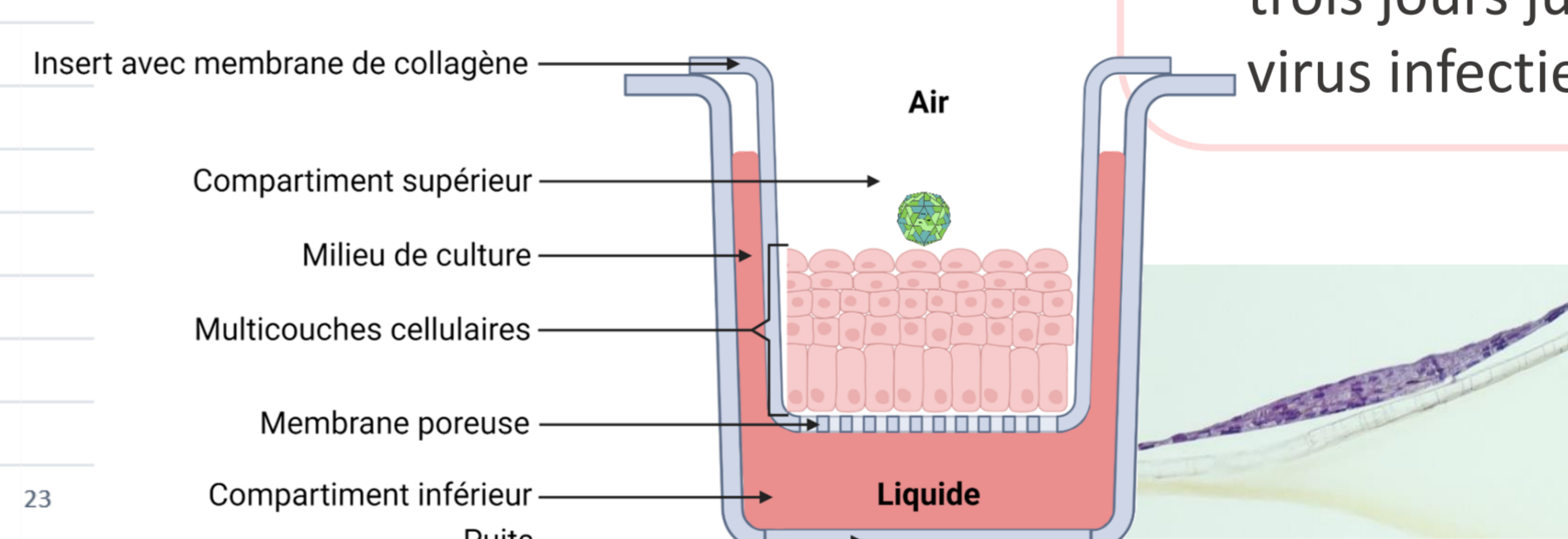
- Les cellules DSP ont été cultivées en monocouches, puis infectées par un virus de la FA de sérotype O à trois multiplicités d'infection (MOI 0,01 ; 0,1 ; 1).
- Les surnageants de culture ont été récoltés tous les deux ou trois jours jusqu'à 112 dpi, puis analysés à la recherche de virus infectieux, d'antigènes et d'ARN viraux.



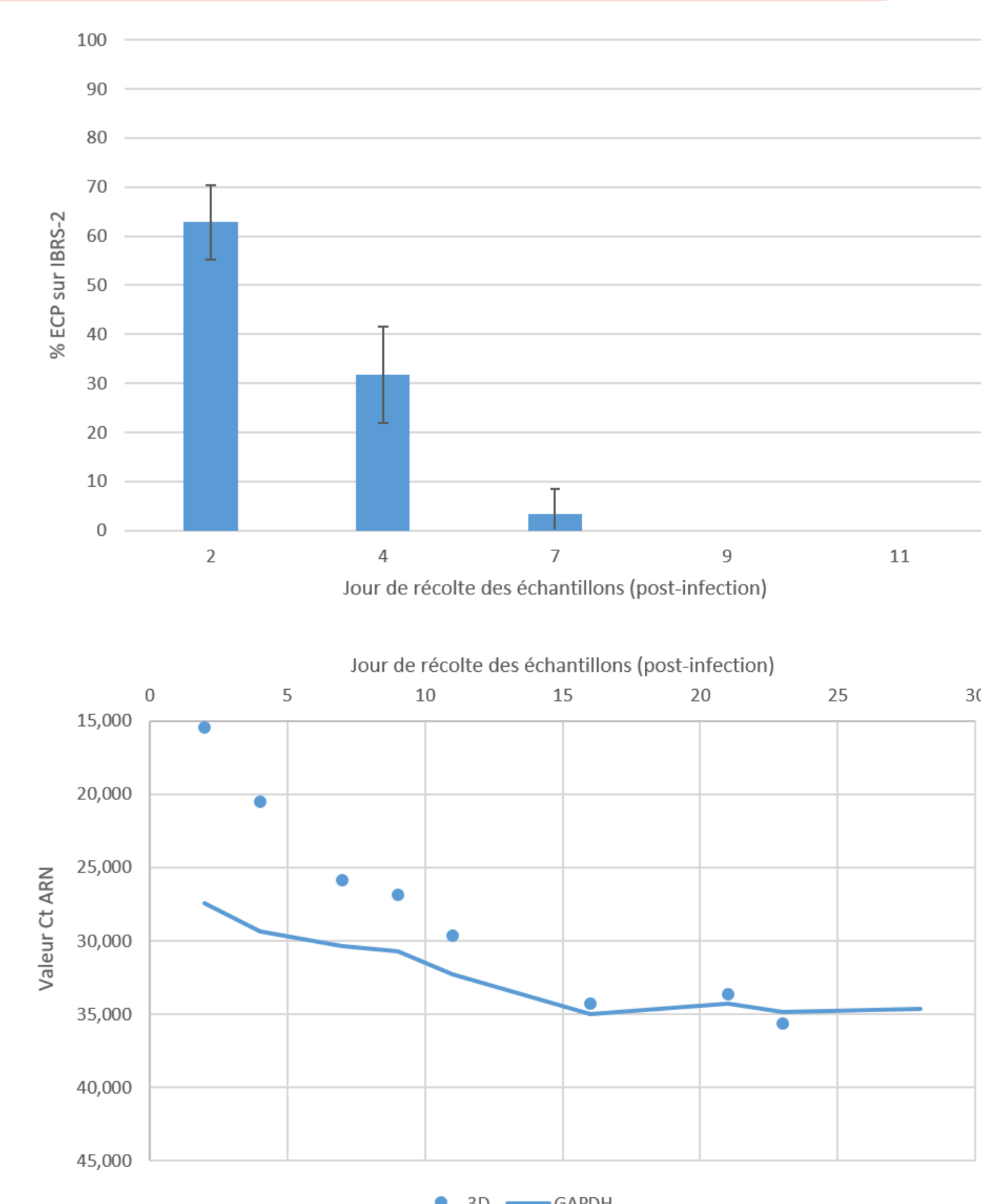
- La MOI 1 a été retenue comme la condition d'infection à privilégier pour ces cellules.
- Détection de virus infectieux par isolement viral jusqu'à 14 dpi dans les surnageants de culture.
- Détection d'antigènes viraux par immunofluorescence jusqu'à 16 dpi.
- Détection d'ARN viraux par RTqPCR jusqu'à 60dpi.

## ④ Infection des DSP en multicouches

- Les cellules DSP ont été cultivées en multicouches, sur membrane de collagène, à l'interface air-liquide, puis infectées par un virus de la FA de sérotype O à la MOI 1.
- Les surnageants de culture ont été récoltés tous les deux ou trois jours jusqu'à 39 dpi, puis analysés à la recherche de virus infectieux, d'antigènes et d'ARN viraux.



- Détermination de l'épaisseur des multicouches par marquage HES.
- Détection de virus infectieux par isolement viral jusqu'à 7 dpi dans les surnageants de culture.
- Détection d'antigènes viraux par immunofluorescence jusqu'à 9 dpi.
- Détection d'ARN viraux par RTqPCR jusqu'à 23dpi.



## Conclusion & perspectives

- Nous avons réussi à développer un modèle de cellules épithéliales issues du palais mou dorsal de porc, sensibles à l'infection par le virus de la FA.
- Un tel modèle n'a pas pu être développé à partir des cellules des amygdales oropharyngées qui n'ont pas survécu en culture.
- Conformément à ce qui a été observé *in vivo* chez le porc, aucun signe de persistance du virus de la FA n'a pu être détecté dans notre modèle cellulaire (aucun virus infectieux détecté après 28 dpi).

- Les cellules DSP porcines pourraient être immortalisées afin d'obtenir une lignée cellulaire adaptée à la recherche et au diagnostic du virus de la FA.
- Ces cellules pourraient constituer un outil de choix dans le diagnostic différentiel de la FA, sous réserve de sensibilité aux autres virus.

## Références

- Stenfeldt C, Arzt J. The Carrier Conundrum; A Review of Recent Advances and Persistent Gaps Regarding the Carrier State of Foot-and-Mouth Disease Virus. *Pathogens* [Internet]. 28 févr 2020 [cité 30 sept 2020];9(3).
- Stenfeldt C, Pacheco JM, Rodriguez LL, Arzt J. Early Events in the Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease in Pigs; Identification of Oropharyngeal Tonsils as Sites of Primary and Sustained Viral Replication. *PLoS One* [Internet]. 3 sept 2014 [cité 18 janv 2021];9(9). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4153717/>
- Stenfeldt C, Pacheco JM, Smoliga GR, Bishop E, Pauszek SJ, Hartwig EJ, et al. Detection of Foot-and-mouth Disease Virus RNA and Capsid Protein in Lymphoid Tissues of Convalescent Pigs Does Not Indicate Existence of a Carrier State. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2016;63(2):152-64.

XXVèmes Journées Francophones de Virologie – Institut Pasteur de Paris – 17-18 avril 2023

Merci à Benoit Lecuelle et au PRBM pour la mise à disposition des porcs.