

Présentation de la technique de coupes de précision de tissus permettant l'étude d'infections et co-infections sur des tissus complexes cultivés *ex vivo*.

Caroline Hervet-Limousin<sup>1</sup>, Nicolas Bertho<sup>1</sup>, François Meurens<sup>1</sup>



Caroline Hervet-Limousin. Technicienne de recherche INRAE au sein de l'UMR BIOEPAR depuis 2015. J'exerce mon activité au sein de l'équipe ImmunoCare. Je participe à différents projets alliant culture cellulaire, biologie moléculaire et immunologie afin d'étudier les maladies respiratoires dans l'espèce porcine.



Nicolas Bertho. Chargé de recherche INRAE, spécialiste en immunologie porcine. Ses projets de recherches portent sur les réponses immunes innées et adaptatives aux mono- et co-infections respiratoires, principalement grippe et SDRP ainsi que sur l'induction d'un entraînement immunitaire systémique et périphérique des cellules myéloïdes permettant une protection à large spectre des animaux.



François Meurens. Professeur à Oniris et responsable de l'équipe ImmunoCare de l'unité INRAE/Oniris BIOEPAR. Le Dr Meurens effectue plus particulièrement ses recherches dans l'espèce porcine où il a travaillé à la mise en place de nouveaux modèles d'infection et où il s'intéresse depuis quelques années aux co-infections virales ciblant l'appareil respiratoire.

**Résumé.** Cet article présente une technique permettant d'obtenir et de cultiver *in vitro* des coupes (*slices*) de tissus biologiques. Des coupes réalisées sur du tissu pulmonaire dans le but d'étudier la réponse immunitaire aux infections respiratoires virales porcines sont plus particulièrement présentées. La technique des tranches tissulaires rapportée ici peut également être utilisée pour étudier le métabolisme et la réponse de différents types d'organes à d'autres agents pathogènes ou à des composés toxiques (1, 2, 3, 4, 5, 6). L'étude des interactions hôte-pathogènes sur des lignées cellulaires ne prend pas en compte la complexité du tissu pulmonaire et la diversité de ses composants cellulaires. Lors d'études d'infections ou co-infections pulmonaires, il est important d'avoir un certain nombre de « *replicates* » afin de pouvoir effectuer une analyse statistique des résultats. Les techniques de cultures de coupes de précision sont une alternative à l'expérimentation animale et s'inscrivent dans

---

<sup>1</sup> BIOEPAR, INRAE, Oniris, 44307 Nantes, France

Correspondance : BIOEPAR, INRAE, Oniris, UMR1300, Route de Gachet, CS 40706, 44307 Nantes cedex 3, France  
Adresse mail : caroline.hervet@inrae.fr

le respect de la règle des 3R : « réduire » (le nombre d'animaux utilisés), « raffiner » (les conditions expérimentales) et « remplacer » lorsque c'est possible par des techniques *in vitro* ou *ex vivo*. Nous avons acquis un appareil « **Tissue slicer** » permettant d'obtenir des coupes de précision de tissu (PCLS) qui, mises en culture, prennent en compte l'architecture du tissu et permettent l'étude *in situ* des interactions cellulaires au niveau du tissu pulmonaire. Ces coupes (*slices*) conservent en partie les capacités moléculaires et l'hétérogénéité fonctionnelle du tissu permettant l'évaluation de la réponse immunitaire dans un cadre qui se rapproche des conditions *in vivo* avec une viabilité d'une à deux semaines, permettant l'étude d'infections et de co-infections (7, 8).

**Mots-Clés** : 3R, culture cellulaire, infection, PCLS, poumon, porc

**Abstract.** In this paper, we describe a technique that allows getting slices of biological tissues followed by their *in vitro* culture and infection. Some slices made on pulmonary tissues are presented in order to study the immunologic response to viral respiratory diseases of pigs. This technique of tissue slices' culture can also be used to study the tissue metabolism or its response to toxic in various organs (1, 2, 3, 4, 5, 6). The lung tissue is complex and infection studies using cell lines do not take into account the tissue architecture and the diversity of its cell component. When studying lung infection or co-infection, it is important to perform a number of replicates, according to the measured traits, for the statistical analysis of results. This technique can be an alternative to *in vivo* experiments. It conforms to the 3R standards: « reducing » the number of animals, « refining » the experimental protocol, and replacing when possible animal experiments through *ex vivo* methods. We got a « Tissue slicer » device that allows getting "Precision Cut Lung Slices" (PCLS) representative of the tissue multicellular complexity and that allows studying extracellular interactions in the pulmonary tissue. In these slices the tissue architecture and cell interactions are partially preserved as well as their molecular capacities and functional heterogeneity thus allowing the follow up of the immunological response with a tissue viability of one or two weeks, which allows studying infections and co-infections (7, 8).

**Keywords:** 3R, lung tissue culture, infection, PCLS, Lung, Porcine

## Matériel et méthodes

**Équipement** : Tissue slicer (Modèle MD4000-01, TSE systems, Munford, Alabama, État-Unis) (Krumdiek)



## Réactifs

Afin de permettre la solidification de l'organe à faible température, nous utilisons un agarose *low melting* (Sigma, A9045). L'agarose, une fois liquéfié à des températures supérieures à 65°C, reste fluide lorsqu'il est conservé à 37°C, et se gélifie uniquement lorsque la température descend en-dessous de 25°C. Le milieu RPMI 1640 2x (500 mL, Eurobio/Biowest, P0870) permet d'apporter les nutriments nécessaires aux cellules de l'organe. Ce milieu

## Le Cahier des Techniques de l'Inra 2021 (106)

est supplémenté avec 2 % antibiotiques et antimycotiques (Eurobio, Liquide CABPSA00-0U) soit Pénicilline 200 UI/mL-Streptomycine 200 µg/mL-Amphotéricine B 0,5 µg/mL, Enrofloxacin 20µg/mL (Baytril) et Clotrimazole 2 ng/mL (Aurizon) afin de limiter le développement de la flore commensale ou de bactéries contaminant le prélèvement.

### Préparation du prélèvement

Un lobe pulmonaire, au choix, est prélevé le plus tôt possible après l'abattage et la saignée de l'animal (<15 minutes). Un mélange volume à volume d'agarose et de RPMI 2x est injecté doucement dans les voies respiratoires par la bronche à l'aide d'une seringue reliée à une canule. Il est important d'injecter doucement tout en massant le poumon afin de bien répartir le mélange, de minimiser la pression de gonflage et ainsi d'éviter des lésions pulmonaires. Le volume du mélange (2 litres pour un lobe pulmonaire porcine- porc de 125 kg) est à adapter en fonction de la taille du lobe. Le lobe est suffisamment rempli lorsque le mélange suinte légèrement du lobe qui doit être bien tendu et dur. Le mélange agarose/milieu de culture se solidifie à des températures inférieures à 25°C, il est donc important que tout le processus (abattage, extraction du poumon, injection du milieu) soit rapide (une demi-heure environ) pour qu'il ait lieu avant le refroidissement de l'organe. Il ne faut pas que le mélange soit trop chaud afin de ne pas détériorer les cellules. Le mélange agarose (37-40°C) milieu (25°C) est donc réalisé juste avant d'être injecté dans le lobe pulmonaire. Une fois le lobe pulmonaire rempli de milieu, la bronche est clampée afin d'éviter au mélange milieu/agarose de ressortir (Figure 01). L'organe est ainsi placé dans un sac plastique, lui-même posé dans de la glace afin d'amorcer une solidification rapide de l'agarose. L'agarose solidifié maintient l'état gonflé du lobe pulmonaire et empêche l'affaissement des voies respiratoires et des alvéoles lors du tranchage. La réalisation des coupes doit être effectuée sous trois heures afin de garantir une viabilité tissulaire suffisante.

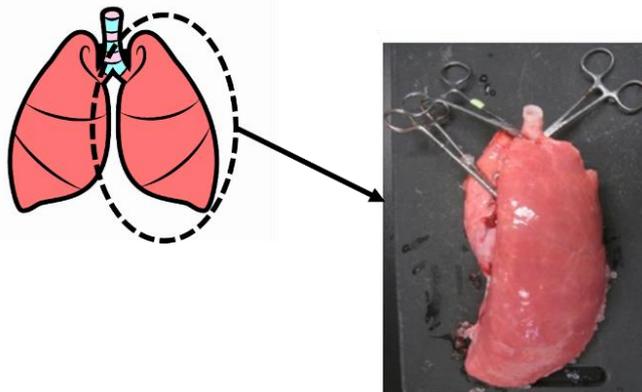


Figure 01 : Position des clamps sur le poumon

### Réalisation des « Precision cut lung slices » (PCLS)

L'organe ainsi solidifié est coupé transversalement en tranches d'environ 1,5 cm (Schema02 : A). De petits morceaux cylindriques (« carottes »), chacun contenant une bronchiole afin d'avoir des coupes homogènes, sont préparés à l'aide d'un emporte-pièce (Schema02 : B). Le « *Tissue slicer* » est rempli avec 800 mL de RPMI 1x supplémenté d'antibiotiques et d'antimycotiques. Un cylindre de tissu est introduit dans l'appareil à l'endroit où la lame viendra couper les tranches (schema02 : C). La vitesse de coupe (60 coupes par minute) ainsi que l'épaisseur des coupes désirées (100 à 500 µm) sont sélectionnées. Les coupes sont réalisées de manière automatique par l'appareil et ressortent dans le tube de récupération (schema02 : D). Le milieu ainsi que les tranches sont ensuite récupérés dans un bécher stérile de 1 L en relâchant la pince de serrage (vidéo **Tissue Slicing**: <https://www.alspi.com/videos-ARD.htm>). Nous pouvons assez aisément obtenir 300 coupes à partir d'un lobe pulmonaire.



A: coupe de tranches B: cylindres de poumons C: production des coupes D: récupération des coupes

Schéma 02 : processus de production de coupes de précision.

Un premier tri est effectué en sélectionnant les tranches entières présentant une lumière bronchique (schéma 03). Les coupes sont placées dans de grandes boîtes de Pétri (076060SD- Dustcher) contenant du milieu RPMI 1X avec 1 % d'antibiotiques, antimycotiques et 5 % SVF (50/boîtes). Les boîtes de Pétri sont placées dans un incubateur à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. Au bout d'une heure, les PCLS sont transférées dans une nouvelle boîte de Pétri contenant du nouveau milieu pré-incubé à 37°C / 5 % CO<sub>2</sub>. Cette opération de lavage des tranches s'effectue quatre fois afin de permettre au mélange agarose/milieu de fondre et d'être éliminé de la coupe de tissu.

### Test de viabilités

Au bout de 24 heures, une observation microscopique (x200 à x400) du mouvement des cils des cellules épithéliales valide la viabilité des PCLS de poumon (schéma 03).

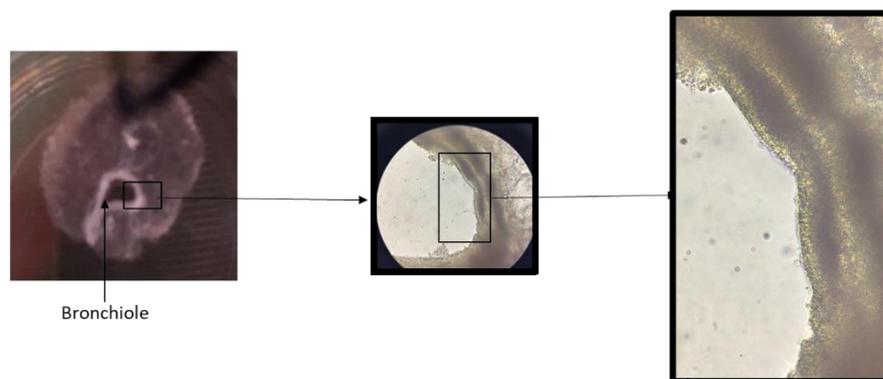


Schéma 03 : Observation des coupes de précision. A: coupe de précision à l'œil nu, B: lumière d'une bronchiole (x200)

La viabilité des cellules des coupes de précision est évaluée par un test de bronchoconstriction suite à l'addition de méthacholine (chlorure d'acétyl- $\beta$ -méthylcholine, Sigma-Aldrich). La méthacholine est ajoutée aux coupes et des images sont prises 5 min après le traitement. Conformément à l'étude de Martin *et al.*, des concentrations de  $10^{-10}$  à  $10^{-3}$  mol/L ont été testées et nous avons retenu la concentration  $10^{-4}$ . Les tranches témoins sont traitées avec des volumes équivalents de RPMI pur pour éliminer la possibilité que l'ajout du milieu soit un stimulus suffisant pour provoquer une bronchoconstriction des bronchioles. La méthacholine agit comme agoniste non sélectif des récepteurs muscariniques pour stimuler le système nerveux parasympathique. L'observation de phénomènes de bronchoconstriction par microscopie optique (Olympus CKX31, Tokyo, Japon) permet de suivre la viabilité des coupes au cours du temps (schéma 04- schéma 05). Il peut être constaté qu'à partir du 11<sup>ème</sup> jour, la viabilité des tranches est réduite. Une variation très faible dans le diamètre des bronchioles est notée. La viabilité des PCLS

## Le Cahier des Techniques de l'Inra 2021 (106)

peut être maintenue jusqu'à 8 à 10 jours après la mise en culture pour les PCLS de porc (8) avec une perte d'activités ciliaires plus ou moins marquée.

La viabilité peut également être étudiée en mesurant sur une fraction de la culture, l'activité mitochondriale par l'utilisation du test de bromure de 3-(4,5-diméthyl thiazol-2yl)-2,5-diphényl tétrazolium (test MTT) (7), bien que nous ne l'ayons pas effectué.

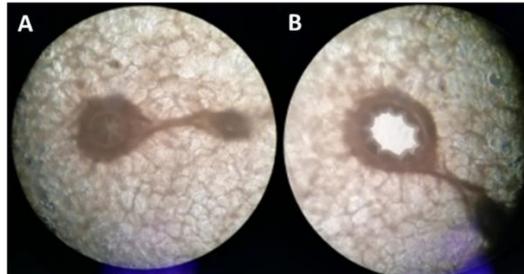


Schéma 04 : A : Bronchiole vaso constriction  
B : Bronchiole vaso dilatation

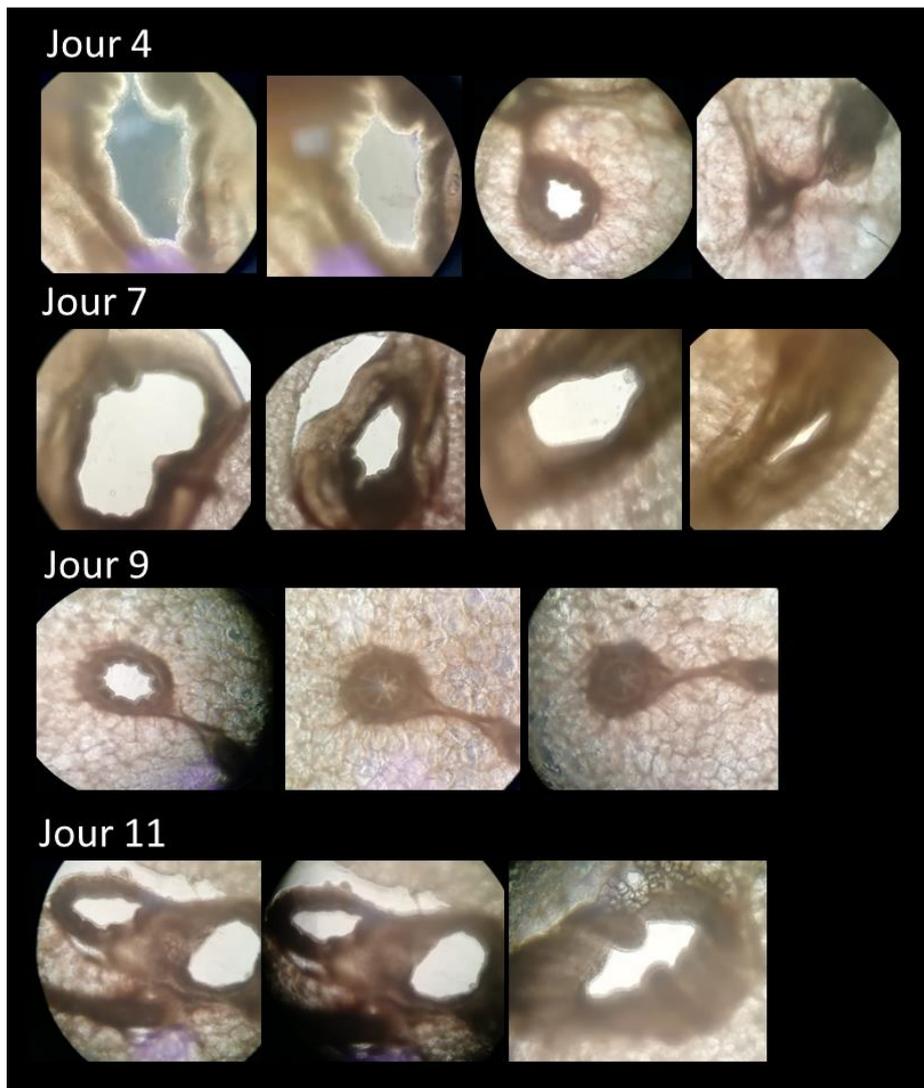


Schéma 05 : Suivi de la bronchoconstriction

## Conclusions

Dans nos études, une digestion des PCLS par un mélange d'enzymes (Collagenase, Dispase, DNase) nous a permis d'évaluer à environ  $5 \cdot 10^4$  le nombre de cellules par PCLS. Des analyses en cytométrie en flux sont en cours afin de déterminer plus précisément les populations cellulaires présentes dans les PCLS.

Dans nos études d'infections et co-infections virales, les PCLS sont placées après lavage dans des plaques 24 puits (1 PCLS/puits), puis infectées par les virus de l'influenza et du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP) ( $10^5$  TCID<sub>50</sub>/PCLS/virus). Le virus Influenza a été détecté dans les cellules épithéliales (exprimant l' $\alpha$ -tubuline), le virus SDRP dans les macrophages alvéolaires (exprimant les molécules du CMH-II) par des marquages en immunofluorescence (microscopie confocale). Sur d'autres PCLS des extractions d'ARN ont été réalisées ; nous avons obtenu de 250 à 500 ng d'ARN par PCLS (extraction Trizol + kit RNeasy micro plus (Qiagen)). La réponse immunitaire a été étudiée par recherche des cytokines d'intérêt en RT-PCR quantitative. La présence de virus a également pu être détectée par RT-PCRq (8). Nous avons ainsi pu mettre en évidence que le virus SDRP interfère très significativement avec le virus influenza en PCLS. En effet nous avons pu montrer que la co-infection du virus SDRP avec le virus influenza pourrait avoir un impact sur la capacité de réplication du virus influenza avec les PCLS, résultats similaires à nos observations sur une lignée cellulaire épithéliale porcine.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA).



<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Le Cahier des Techniques de l'Inra », la date de sa publication et son URL).

## Bibliographie

1-Lyons-Cohen MR, Thomas SY, Cook DN, Nakano H. Precision-cut Mouse Lung Slices to Visualize Live Pulmonary Dendritic Cells. *J Vis Exp.* 2017 Apr 5;(122):55465. doi: 10.3791/55465. PMID: 28448013; PMCID: PMC5512285.

2-Asafadi HN, Uhl FE, Pineda RH, Bailey KE, Rojas M, Wagner DE, Königshoff M. Applications and Approaches for Three-Dimensional Precision-Cut Lung Slices. *Disease Modeling and Drug Discovery. Am J Respir Cell Mol Biol.* 2020 Jun;62(6):681-691. doi: 10.1165/rcmb.2019-0276TR. PMID: 31991090; PMCID: PMC7401444.

3-Majorova D, Atkins E, Martineau H, Vokral I, Oosterhuis D, Olinga P, Wren B, Cuccui J, Werling D. Use of Precision-Cut Tissue Slices as a Translational Model to Study Host-Pathogen Interaction. *Front Vet Sci.* 2021 Jun 4;8:686088. doi: 10.3389/fvets.2021.686088. PMID: 34150901; PMCID: PMC8212980.

4-Bai Y, Krishnamoorthy N, Patel KR, Rosas I, Sanderson MJ, Ai X. Cryopreserved Human Precision-Cut Lung Slices as a Bioassay for Live Tissue Banking. A Viability Study of Bronchodilation with Bitter-Taste Receptor Agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016 May;54(5):656-63. doi: 10.1165/rcmb.2015-0290MA. PMID: 26550921; PMCID: PMC4942196.

## Le Cahier des Techniques de l'Inra 2021 (106)

5-Krumdieck CL, dos Santos JE, Ho KJ. A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. *Anal Biochem*. 1980 May 1;104(1):118-23. doi: 10.1016/0003-2697(80)90284-5. PMID: 6770714.

6-Liu G, Betts C, Cunoosamy DM, Åberg PM, Hornberg JJ, Sivars KB, Cohen TS. Use of precision cut lung slices as a translational model for the study of lung biology. *Respir Res*. 2019 Jul 19;20(1):162. doi: 10.1186/s12931-019-1131-x. PMID: 31324219; PMCID: PMC6642541.

7-Vietmeier J, Niedorf F, Bäumer W, Martin C, Deegen E, Ohnesorge B, Kietzmann M. Reactivity of equine airways-a study on precision-cut lung slices. *Vet Res Commun*. 2007 Jul;31(5):611-9. doi: 10.1007/s11259-007-3501-y. Epub 2007 Jan 24. PMID: 17252319.

8-Saade G, Ménard D, Hervet C, Renson P, Hue E, Zhu J, Dubreil L, Paillot R, Pronost S, Bourry O, Simon G, Dupont J, Bertho N, Meurens F. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Interferes with Swine Influenza A Virus Infection of Epithelial Cells. *Vaccines (Basel)*. 2020 Sep 5;8(3):508. doi: 10.3390/vaccines8030508. PMID: 32899579; PMCID: PMC7565700.

9-Wohlsen A, Martin C, Vollmer E, Branscheid D, Magnussen H, Becker WM, Lepp U, Uhlig S. The early allergic response in small airways of human precision-cut lung slices. *Eur Respir J*. 2003 Jun;21(6):1024-32. doi: 10.1183/09031936.03.00027502. PMID: 12797499.

10-Martin C, Uhlig S, Ullrich V. Videomicroscopy of methacholine-induced contraction of individual airways in precision-cut lung slices. *Eur Respir J*. 1996 Dec;9(12):2479-87. doi: 10.1183/09031936.96.09122479. PMID: 8980957.