

LES ORGANOÏDES DE LAPIN : UN NOUVEL OUTIL POUR TESTER *IN VITRO* DES SOLUTIONS INNOVANTES DE PRESERVATION DE LA SANTE DIGESTIVE

Beaumont M.^{1*}, Alberge J.¹, Malonga T.¹, Le Gall-Reculé G.², Bertagnoli S.³

¹ GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Castanet-Tolosan, France.

² Unité de Virologie Immunologie Parasitologie Aviaires et Cunicoles, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, ANSES, 22440 Ploufragan, France.

³ IHAP, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, 31300 Toulouse, France.

*Auteur correspondant : martin.beaumont@inrae.fr

Résumé – Le lapin est une espèce particulièrement sensible aux troubles digestifs, en particulier lors du sevrage et dans le cas de maladies infectieuses. Il est donc nécessaire de disposer de modèles *in vitro* permettant d'étudier la physiologie des organes digestifs chez le lapin tout en réduisant le recours à l'expérimentation animale. Récemment, les recherches ont permis de mieux comprendre la biologie des cellules souches, des cellules indifférenciées pouvant se diviser pour générer divers types de cellules spécialisées. Ces nouvelles connaissances ont permis de développer des modèles de culture cellulaire innovants appelés organoïdes. Les organoïdes sont issus de cellules souches, s'autorenouvellent, sont autoorganisés en 3-dimensions, reproduisent la diversité cellulaire et certaines des fonctions des organes qu'ils miment. Ces méthodes initialement mises au point chez la souris et l'homme sont aujourd'hui disponibles pour les animaux d'élevage. Chez le lapin, des travaux récents ont développé des systèmes de culture d'organoïdes d'intestin et de foie qui permettent de disposer pour la première fois chez cette espèce de modèles cellulaires *in vitro* pour étudier ces organes. Comme décrit chez les autres espèces, les organoïdes de lapin miment en partie la diversité cellulaire, la structure et la fonctionnalité des organes d'origine. Les organoïdes hépatiques de lapin ont par exemple permis de multiplier *in vitro* le virus de la maladie hémorragique virale du lapin (RHDV). Ce résultat qui n'avait pas été atteint avec d'autres modèles ouvre d'importantes perspectives pour étudier la pathogénicité de ce virus. Par ailleurs, les organoïdes d'intestin de lapin ont été utilisés pour étudier les effets du microbiote et de ses métabolites sur la fonction de barrière. Le modèle des organoïdes intestinaux est particulièrement adapté pour réaliser des approches de criblage *in vitro* de produits nutritionnels ciblant la santé digestive. La disponibilité des organoïdes chez le lapin ouvre donc d'importantes perspectives pour étudier la physiologie digestive ainsi que les interactions avec des pathogènes. La complexification des conditions de culture des organoïdes de lapin permettra de reproduire plus fidèlement les organes *in vitro*, par exemple en intégrant des composants du système immunitaire. Enfin, des organoïdes de nouveaux organes pourront être développés chez le lapin, tel que réalisé récemment pour la glande mammaire. Globalement, l'utilisation des organoïdes chez le lapin pourra être utile pour développer de nouvelles stratégies de préservation de la santé tout en réduisant le recours à l'expérimentation animale.

Abstract – Rabbit organoids: a new tool for *in vitro* testing of innovative solutions to preserve digestive health

Rabbits are particularly sensitive to digestive disorders, especially during weaning and in the case of infectious diseases. *In vitro* models are therefore needed to study the physiology of the digestive organs in rabbits, while reducing the need for animal experiments. Recently, research has led to a better understanding of the biology of stem cells, undifferentiated cells that can divide to generate various types of specialized cells. This new knowledge has led to the development of innovative cell culture models called organoids. Organoids are derived from stem cells, are self-renewing, are self-organized in 3-dimensions and reproduce the cellular diversity and some of the functions of the organs they mimic. These methods, initially developed in mice and humans, are now available for farm animals. In rabbits, recent work has developed intestinal and liver organoid culture systems that provide *in vitro* cell models for studying these organs for the first time in this species. As described for other species, rabbit organoids partially mimic the cellular diversity, structure and functionality of the original organs. For example, rabbit liver organoids have been used to propagate the rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) *in vitro*. This result, which had not been achieved with other models, opens up important prospects for studying the pathogenicity of this virus. Rabbit intestinal organoids have also been used to study the effects of the microbiota and its metabolites on barrier function. The intestinal organoid model is particularly well suited to *in vitro* screening of nutritional products targeting digestive health. The availability of organoids in rabbits opens up major prospects for studying digestive physiology and interactions with pathogens. The increasing complexity of culture conditions for rabbit organoids will make it possible to reproduce organs more faithfully *in vitro*, for example by incorporating components of the immune system. Finally, organoids of new organs could be developed in rabbits, as was recently achieved for the mammary gland. Overall, the use of organoids in rabbits could be useful for developing new health preservation strategies while reducing the need for animal experimentation.

Introduction

L'appareil digestif a pour rôle d'assurer la nutrition et la protection de l'organisme. L'étude de la physiologie digestive chez le lapin est cruciale compte tenu de la sensibilité de cette espèce aux troubles intestinaux (Combes et al. 2013). En effet, un dysfonctionnement de l'appareil digestif du lapin peut être observé lors de la période de transition alimentaire du sevrage (Gidenne et al. 2012) où dans le cas de maladies infectieuses telles que l'entéropathie épizootique du lapin (EEL) (Licois et al. 2005), les colibacillooses ou les coccidioses. Dans le contexte de la réduction de l'utilisation des intrants médicamenteux dans les élevages, il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies de préservation de la santé digestive chez le lapin. L'alimentation constitue un levier prometteur pour renforcer la barrière intestinale (Gidenne 2015), notamment via la modulation du microbiote intestinal dont le rôle central dans la physiologie digestive est clairement établi (Paës et al. 2023). Néanmoins, des travaux de recherches sont encore nécessaires pour développer de manière efficace ces nouvelles méthodes de préservation de la santé digestive. Par ailleurs, le foie, un organe jouant un rôle clé dans la digestion, est aussi la cible des infections par les lagovirus pathogènes dont le virus de la maladie hémorragique virale du lapin (RHVDV), une menace majeure pour les lapins en raison de sa forte létalité, mais dont les mécanismes de pathogénicité sont encore peu compris faute de système de multiplication *in vitro* efficace.

L'étude de la physiologie et des maladies intestinales et hépatiques du lapin repose essentiellement sur l'expérimentation animale. Ces expérimentations *in vivo* ont pour limites un coût élevé, la longueur des cycles expérimentaux, ainsi qu'un manque de standardisation lié à la difficulté de contrôle des conditions expérimentales. Par ailleurs, l'expérimentation animale est remise en question pour des raisons éthiques par la société. C'est dans ce contexte que sont développées des approches *in vitro*, permettant de réduire l'expérimentation animale tout en standardisant les conditions expérimentales et en limitant les coûts. Cependant, contrairement aux espèces humaines ou porcines, il n'existe pas chez le lapin de lignées immortalisées de cellules digestives *in vitro*. Récemment, les progrès dans la compréhension de la biologie des cellules souches (cellules indifférenciées capable de générer diverses cellules spécialisées) ont permis de développer des modèles d'organoïdes chez de nombreuses espèces, dont le lapin (Beaumont et al. 2021a; Günther et al. 2022). Ces modèles de culture cellulaire innovants permettent de reproduire *in vitro* une partie de la complexité cellulaire, de la structure et certaines des fonctions des organes qu'ils visent à mimer.

La première partie de cette synthèse présente les aspects de la physiologie intestinale et hépatique modélisés dans les organoïdes digestifs de lapin. La seconde partie est centrée sur les méthodes de culture et les caractéristiques des organoïdes intestinaux et hépatiques de lapin. La troisième partie présente les applications des organoïdes de lapin. Enfin, les perspectives de complexification des conditions de culture des organoïdes de lapin ainsi que de nouveaux domaines d'utilisation potentiels sont présentés.

1. Organisation de l'appareil digestif chez le lapin

1.1. Organisation et diversité cellulaire de l'intestin

L'intestin est divisé en deux segments principaux : l'intestin grêle (comprenant le duodénum, le jéjunum et l'iléon) et le gros intestin (comprenant le caecum et le côlon). L'intestin grêle permet la digestion et l'absorption des nutriments. Le gros intestin a pour rôle principal l'absorption d'eau, d'électrolytes et de produits de fermentation bactérienne (Blas and Wisewan 2020). En effet, l'intestin est colonisé par une vaste communauté de microorganismes dont la densité est la plus élevée au niveau du gros intestin.

La muqueuse intestinale est bordée par une couche de cellules épithéliales. Dans l'intestin grêle, cet épithélium est organisé en cryptes et en villosités tandis que seules les cryptes sont présentes dans le gros intestin. Des cellules souches épithéliales situées au fond des cryptes assurent le renouvellement complet de l'épithélium intestinal en quelques jours et sont à l'origine de tous les types de cellules épithéliales différenciées (Figure 1) (Grant and Specian 2001; Bonis et al. 2021). Les cellules épithéliales se différencient lors de leur migration dans l'axe de la crypte sous le contrôle de gradients de concentration de facteurs de croissance (Barker 2014).

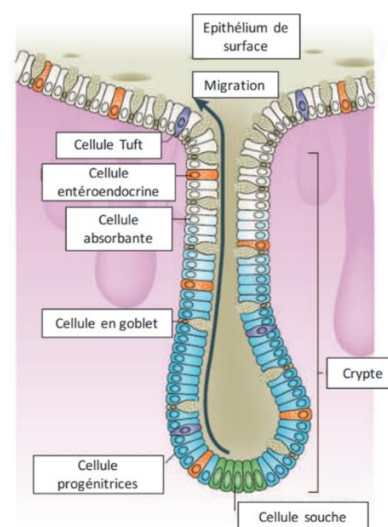


Figure 1 : Structure et diversité cellulaire de l'épithélium intestinal. Adapté de (Barker 2014).

Les cellules épithéliales intestinales différenciées sont classées en cellules absorbantes ou sécrétrices. Les cellules absorbantes contribuent à la digestion et à l'absorption des nutriments. Récemment, notre équipe a identifié un sous-type de cellules absorbantes (cellules BEST4⁺) dans l'intestin du lapin mais leurs fonctions restent encore inconnues en raison de leur absence chez la souris (Malonga et al. 2024). La majorité des cellules sécrétrices sont des cellules caliciformes responsables de la sécrétion de mucus et de molécules antimicrobiennes (Gustafsson and Johansson 2022). Les cellules de Paneth sont des cellules présentes principalement dans l'intestin grêle et spécialisées dans la sécrétion de peptides antimicrobiens (Bevins and Salzman 2011). Les cellules entéroendocrines sont rares et sécrètent des hormones régulant la digestion et la satiété (Gribble and Reimann 2019). Enfin, les cellules Tuft jouent un rôle dans la détection des parasites ainsi que dans la régulation de l'immunité intestinale mais leur existence chez le lapin n'est pas démontrée (Gerbe et al. 2012). L'action coordonnée de ces divers types cellulaires permet à l'épithélium intestinal d'assurer ses fonctions de nutrition et de barrière. Enfin, l'épithélium intestinal est en interaction permanente avec les cellules immunitaires intestinales et le microbiote. Le dialogue entre ces acteurs joue un rôle décisif dans la défense de l'organisme.

1.2. Organisation cellulaire du foie

Le foie contribue à la digestion via les sécrétions biliaires et joue un rôle central dans le métabolisme des nutriments qui y sont acheminés depuis l'intestin par la veine porte. La position du foie en aval de la barrière intestinale lui confère également un rôle stratégique pour limiter l'entrée des pathogènes ou des toxines dans l'organisme. Le foie des mammifères est organisé en unités fonctionnelles formées par des lobules composés de travées hépatocytaires et de canaux biliaires (Ramachandran et al. 2020; Campana et al. 2021). Des cellules progénitrices (intermédiaires entre des cellules souches et des cellules différenciées) hépatiques se trouvent dans la zone transitoire entre les travées hépatocytaires et les canaux biliaires (passage de Hering) et sont à l'origine des deux types de cellules épithéliales hépatiques : les hépatocytes et les cholangiocytes (Figure 2). Les hépatocytes sont les cellules épithéliales hépatiques les plus abondantes et jouent de nombreux rôles incluant la synthèse protéique, la détoxification, le métabolisme des lipides et des glucides et la production de facteurs de coagulation (Ramachandran et al. 2020). Les hépatocytes sécrètent également la bile dans le canal biliaire formé par des cholangiocytes (cellules épithéliales biliaires). Le foie contient aussi de nombreuses cellules immunitaires tels que les macrophages résidents du foie appelés cellules de Kupffer, des cellules stellaires impliquées dans la production de la matrice extracellulaire et des cellules

endothéliales permettant la filtration des composés sanguins (Ramachandran et al. 2020). Le foie est donc un organe caractérisé par une structure complexe et une grande diversité cellulaire lui permettant d'assurer ses nombreuses fonctions.

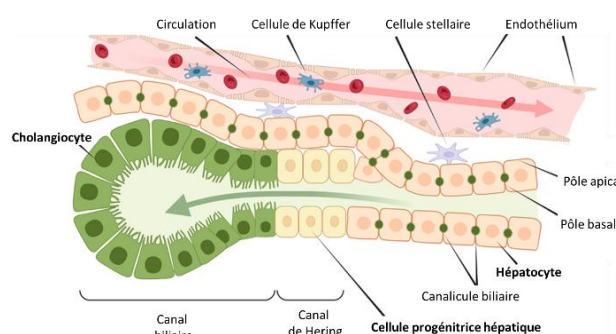


Figure 2 : Structure et diversité cellulaire du foie.
Adapté de (Kardia et al. 2021).

2. Modèles d'organoïdes chez le lapin

La technologie des organoïdes a été développée à partir des années 2000 suite aux progrès dans la compréhension de la biologie des cellules souches (Sato et al. 2009). Le principe de la culture des organoïdes consiste à ensemencer des cellules souches isolées d'un organe d'intérêt dans des conditions reproduisant *in vitro* des caractéristiques clés du microenvironnement des cellules souches (matrice extracellulaire, facteurs de croissances) (Günther et al. 2022). Dans ces conditions, les cellules souches forment en quelques jours des structures composées de divers types cellulaires, capables de s'autoorganiser en 3-dimensions et de reproduire certaines des fonctions de l'organe d'origine. Contrairement aux lignées cellulaires, les organoïdes ne présentent pas d'anomalies génomiques et sont donc plus proche de la physiologie des organes qu'ils miment. De plus, les organoïdes maintiennent le génome de l'individu, ce qui permet d'étudier les liens entre un génotype d'intérêt et un phénotype *in vitro* (par exemple : sensibilité à un pathogène). Les méthodes de culture d'organoïdes ont été développées initialement chez la souris et l'homme et sont désormais disponibles pour la plupart des organes (Günther et al. 2022). Plus récemment, ces méthodes ont été adaptées aux animaux d'élevage pour lesquels des techniques sont aujourd'hui disponibles pour cultiver des organoïdes d'intestin, de foie, de poumons, de glande mammaire, ou du système reproducteur (Beaumont et al. 2021b; Baquerre et al. 2021; Archer et al. 2021). Ces modèles organoïdes sont désormais utilisés en routine pour la recherche chez certaines espèces d'élevage telles que le porc (Mussard et al. 2022, 2023; Alberge et al. 2024), mais restent encore en développement chez le lapin.

2.1. Organoïdes intestinaux de lapin

Deux publications ont décrit en 2020 et 2021 des méthodes pour cultiver des organoïdes intestinaux de lapins d'élevage ou sauvages (Mussard et al. 2020; Kardia et al. 2021). La première étape du protocole consiste à isoler des cryptes de l'épithélium intestinal dans lesquelles se situent des cellules souches (Figure 1). Pour cela, un fragment de muqueuse intestinale est incubé dans une solution de dissociation chimique permettant de déstabiliser le mucus et les jonctions serrées. Une étape de dissociation mécanique permet ensuite de récupérer les cryptes épithéliales. Ces cryptes peuvent ensuite être congelées dans une solution de cryopréservation et stockées dans l'azote liquide pour une utilisation ultérieure ou utilisées immédiatement pour la culture d'organoïdes. Pour cela, les cryptes sont placées dans une goutte d'un gel de protéines de matrice extracellulaire (exemple : Matrigel®) puis un milieu de culture mimant la niche des cellules souches épithéliales intestinales est ajouté. Ce milieu peut être composé uniquement de composés pharmacologiques ou inclure des protéines régulant des voies de signalisation essentielles aux cellules souches (Mussard et al. 2020; Kardia et al. 2021). Il existe également un milieu commercial (Intesticult organoid growth medium®, StemCell Technologies) permettant de cultiver les organoïdes intestinaux de lapins de manière standardisée mais à un coût élevé.

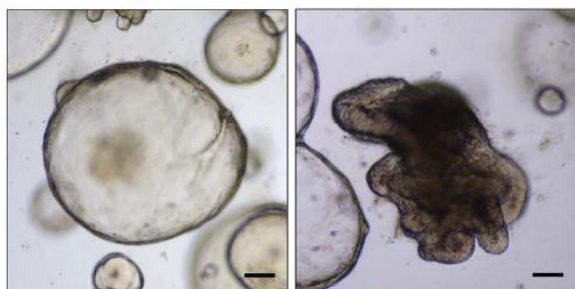


Figure 3 : Morphologie des organoïdes intestinaux de lapin (Kardia et al. 2021). Deux morphologies d'organoïdes sont présentées : sphérique (gauche) et bourgeonnant (droite). La barre d'échelle représente 100 µm.

Les organoïdes intestinaux de lapin sont obtenus en quelques jours. Leur morphologie est généralement sphérique et leur diamètre peut atteindre 500 µm (Mussard et al. 2020) (Figure 3). Ces organoïdes sont formés par une monocouche de cellules épithéliales polarisées et auto-organisées autour d'une lumière contenant des sécrétions et des débris cellulaires. Il a été montré que divers types cellulaires peuvent être présents dans les organoïdes intestinaux de lapin : cellules souches, cellules en prolifération (Figure 4), cellules absorbantes, cellules caliciformes sécrétrices de mucus, cellules entéroendocrines (Mussard et al. 2020; Kardia et al. 2021). Les organoïdes intestinaux de lapin permettent donc de mimer la diversité de

l'épithélium intestinal *in vitro*. Il est également possible d'augmenter le niveau de différenciation des cellules épithéliales d'organoïdes intestinaux de lapin en réduisant la concentration des facteurs de croissance mimant la niche des cellules souches ou en ajoutant des molécules pharmacologiques ciblant des voies de signalisation impliquées dans la différenciation (Mussard et al. 2020; Kardia et al. 2021). Dans ces conditions, les organoïdes peuvent avoir une structure bourgeonnante mimant les cryptes épithéliales (Figure 3). Ainsi, la structure de l'épithélium intestinal observée *in vivo* peut être partiellement reproduite *in vitro*. Par ailleurs, les organoïdes intestinaux de lapin expriment de nombreuses protéines impliquées dans la fonction de barrière de l'intestin (protéines de jonction serrées, peptides antimicrobiens, systèmes de détection de microorganismes) (Mussard et al. 2020). La fonctionnalité de l'épithélium intestinal de lapin peut donc être étudiée *in vitro* dans le modèle des organoïdes.

Des organoïdes intestinaux de lapin ont été obtenus à partir du duodénum, du jéjunum, de l'iléon et du caecum (Mussard et al. 2020; Kardia et al. 2021). Il a été montré chez d'autres espèces que les organoïdes intestinaux conservent les caractéristiques de leur segment digestif d'origine (Middendorp et al. 2014; Mussard et al. 2022). Cette propriété n'a pas encore été vérifiée chez le lapin, mais permettrait de mener des études sur un segment spécifique de l'intestin de lapin, par exemple pour déterminer le segment digestif ciblé par un pathogène.

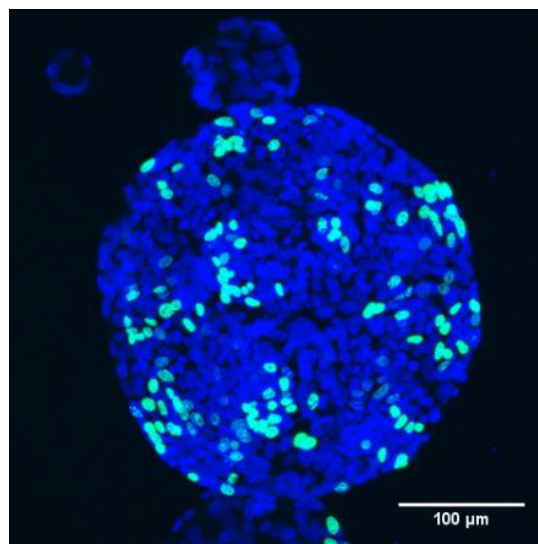


Figure 4 : Prolifération dans les organoïdes intestinaux de lapin (Mussard et al. 2020). Les noyaux cellulaires sont colorés en bleu. Les cellules en prolifération sont colorées en vert.

Il est nécessaire de repiquer les organoïdes intestinaux de lapin 5 à 10 jours après leur mise en culture en raison de l'accumulation de débris et du nombre de cellules trop important en comparaison des ressources

apportées par le milieu. Les organoïdes sont alors dissociés par une méthode enzymatique et les cellules obtenues sont remises en culture selon les méthodes décrites précédemment. Ainsi, la culture des organoïdes peut être maintenue *in vitro* pendant plusieurs semaines ou mois. De plus, les organoïdes intestinaux de lapin peuvent être congelés dans une solution de cryoconservation et stockés dans l'azote liquide avant d'être décongelés et remis en culture selon les besoins expérimentaux. Ces propriétés des organoïdes permettent donc de réaliser un grand nombre d'expériences à partir des cellules souches isolées à partir d'un seul animal. Le modèle des organoïdes permet donc de réduire nettement le nombre de lapins utilisés pour l'expérimentation. Il faut néanmoins noter que des produits d'origine animale (sérum de veau fœtal, Matrigel® issu de souris) sont tout de même utilisés dans les milieux de culture des organoïdes de lapin (Kozłowski et al. 2021).

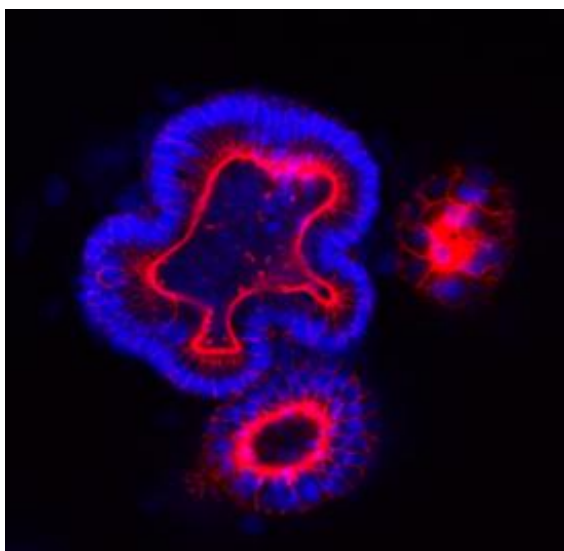


Figure 5 : Polarisation des cellules d'organoïdes intestinaux de lapin (Mussard et al. 2020). Les noyaux cellulaires sont colorés en bleu. Le cytosquelette d'actine marquant les microvillosités situées au pôle apical des cellules est coloré en rouge.

Les cellules des organoïdes intestinaux de lapin sont fortement polarisées et le pôle apical est orienté vers l'intérieur de l'organoïde (Figure 5). Cette disposition reflète l'organisation observée *in vivo* où le pôle apical des cellules épithéliales est exposé aux composés alimentaires et microbiens situés dans la lumière de l'intestin. La difficulté d'accès au pôle apical des cellules épithéliales dans les organoïdes intestinaux de lapin pose problème pour tester de manière physiologique les effets de nutriments ou de microorganismes. Une méthode alternative consiste à dissocier les organoïdes cultivés en 3-dimensions en cellules isolées afin de les cultiver en monocouche en 2-dimensions (Figure 6). Ces conditions de culture

permettent d'accéder de manière simple au pôle apical des cellules tout en conservant la diversité cellulaire et d'étudier les flux au travers de l'épithélium pour caractériser par exemple le transport de nutriments ou la perméabilité intestinale. Globalement, les organoïdes intestinaux de lapin permettent d'étudier l'épithélium intestinal *in vitro* dans des conditions proches de la physiologie en reproduisant certaines des caractéristiques structurales, de diversité cellulaire et fonctionnelles de la barrière intestinale.

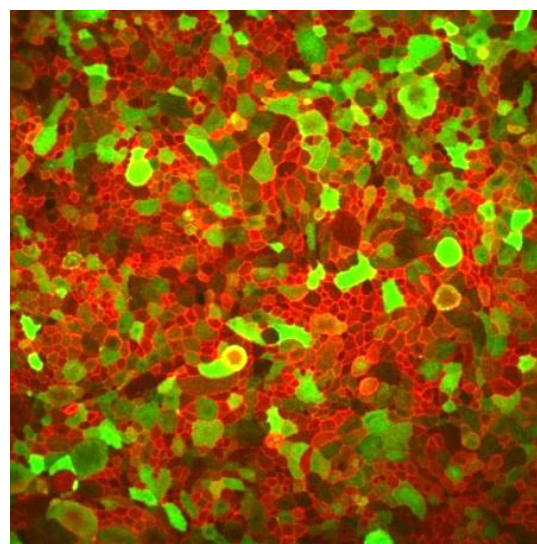


Figure 6 : Observation d'une monocouche de cellules issues d'organoïdes intestinaux de lapin. Le cytosquelette d'actine est marqué en rouge et les cellules sécrétrices en vert. (Données non publiées, UMR GenPhySE, INRAE, Toulouse).

2.2. Organoïdes hépatiques de lapin

Une étude de 2023 a décrit pour la première fois une méthode permettant de cultiver des organoïdes hépatiques de lapins d'élevage ou sauvages (Kardia et al. 2023). Globalement, les méthodes de culture des organoïdes hépatiques sont très similaires à celles utilisées pour cultiver les organoïdes intestinaux. Les organoïdes hépatiques de lapin sont dérivés de cellules progénitrices hépatiques obtenues par dissociation enzymatique des canaux biliaires. Ces cellules sont cultivées dans un gel de matrice extracellulaire et avec un milieu de culture mimant la niche des cellules progénitrices hépatiques en utilisant des réactifs disponibles commercialement. Les organoïdes hépatiques de lapin présentent une morphologie sphérique (Figure 7) et sont composés en majorité de cholangiocytes et d'une minorité d'hépatocytes (Kardia et al. 2023), ces proportions étant inversées par rapport à ce qui est observé *in vivo* (Ramachandran et al. 2020). Les organoïdes hépatiques de lapin peuvent être maintenus en culture par repiquage pendant plusieurs semaines ou être cryoconservés (Kardia et al. 2023).

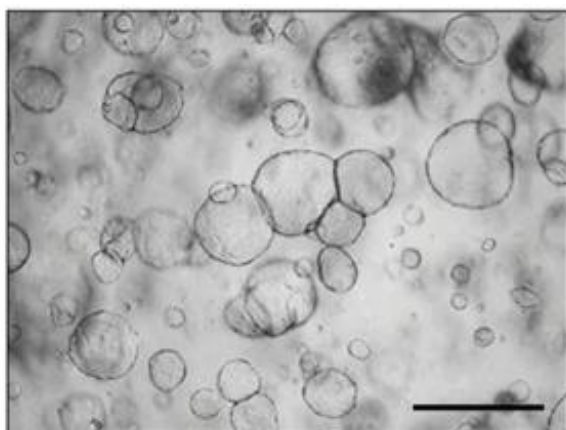


Figure 7 : Observation d'organoïdes hépatiques de lapin cultivés en 3D (Kardia et al. 2023). La barre d'échelle représente 500 μm .

Les monocouches de cellules dérivées d'organoïdes hépatiques sont obtenues de la même façon que dans le cas des organoïdes intestinaux (Figure 8). Les organoïdes hépatiques de lapin ont été caractérisés avec beaucoup moins de détails que les organoïdes intestinaux. Il serait donc intéressant d'approfondir l'étude de ce modèle afin par exemple de déterminer si les cellules des monocouches sont polarisées ou si la structure des canaux biliaires peut être reproduite *in vitro* (Kardia et al. 2023).

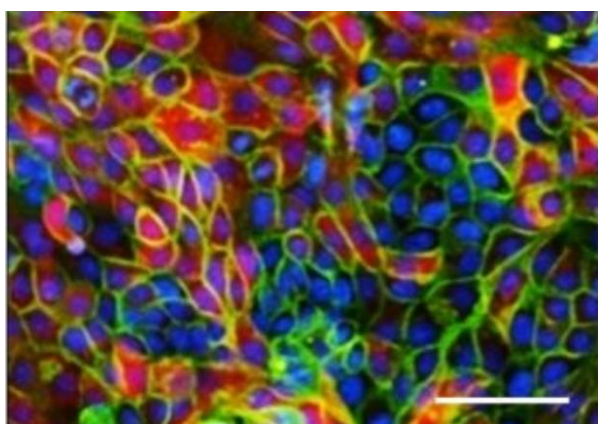


Figure 8 : Observation d'une monocouche de cellules issues d'organoïdes hépatiques de lapin (Kardia et al. 2023). Les noyaux cellulaires sont colorés en bleu, les cellules souches en vert et les cholangiocytes en rouge. La barre d'échelle représente 50 μm .

3. Utilisation des organoïdes de lapin

3.1. Infections virales d'organoïdes de lapin

La maladie hémorragique virale du lapin (RHD) causée par le lagovirus hépatotropique RHDV entraîne une forte létalité et représente une menace majeure pour les élevages et la faune sauvage. Bien que la vaccination permette de protéger efficacement les lapins contre la

RHD, des recherches sont nécessaires pour comprendre le mode d'action cellulaire et moléculaire du RHDV afin de développer des stratégies de prévention ou thérapeutiques dans le contexte de l'émergence possible de nouvelles souches. Cependant, la létalité très rapide du RHDV ne permet pas l'étude approfondie de sa pathogénicité *in vivo* et ce type d'expérimentation est restreint pour des considérations éthiques. Les nombreux essais d'infections de divers modèles de cultures cellulaires *in vitro* n'ont jusqu'à récemment pas été concluants (quelques résultats très limités avec le RHDV1 sur hépatocytes primaires de lapins, et avec un clone infectieux modifié de RHDV1 sur cellules RK13 non confirmés jusqu'ici) (König et al. 1998; Zhu et al. 2017).

En 2023, un groupe de chercheurs australiens est parvenu pour la première fois à démontrer *in vitro* la réplication de trois souches de RHDV de différents génotypes ou variants (RHDV1, RHDVa-K5 et RHDV2) dans des monocouches de cellules dérivées d'organoïdes hépatiques de lapins (Kardia et al. 2023) (Figure 9). Le format de culture en monocouche a été choisi car il permet de mieux standardiser les conditions d'infection par rapport au organoïdes cultivés en 3D. Le RHDV2 est le seul lagovirus testé ayant pu se répliquer à la fois dans des organoïdes hépatiques de lapin et de lièvre, ce qui correspond au tropisme d'espèce décrit *in vivo* (Le Gall-Reculé et al. 2017). De plus, les organoïdes hépatiques de chat ou de souris n'ont pas pu être infectés par les différentes souches de RHDV, tout comme observé récemment dans des organoïdes hépatiques de renard avec le RHDV2 (Smith et al. 2025), ce qui est cohérent avec la spécificité de ces virus pour les léporidés. Des études ont stipulé que le RHDV2 pouvait infecter des mammifères autres que les léporidés suite à la mise en évidence d'ARN dans leur foie, mais aucune réplication virale active n'a été définitivement démontrée (Kardia et al. 2023). Les résultats obtenus par Kardia et al. (2023) soulignent donc l'intérêt du modèle des organoïdes pour étudier les espèces ciblées par un pathogène. Bien que le modèle des organoïdes hépatiques de lapin soit prometteur, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour identifier les types cellulaires infectés par le RHDV (cellules progénitrices, cholangiocytes ou hépatocytes) ainsi que les mécanismes impliqués et évaluer des approches préventives ou thérapeutiques.

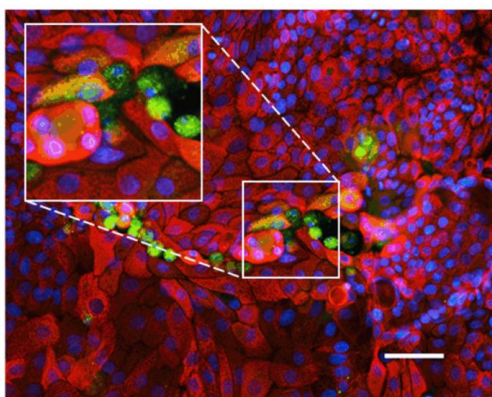


Figure 9 : Observations de monocouche de cellules issues d'organoïdes hépatiques de lapin infecté par le RHDV2 (Kardia et al. 2023). Les noyaux cellulaires sont colorés en bleu, les cholangiocytes en rouge et la protéine de capsid du RHDV2 en vert. La barre d'échelle représente 100 µm.

Dans une étude préliminaire non publiée, nous avons essayé d'infecter des organoïdes de duodénum et de caecum de lapin, différenciés ou non, avec des souches de RHDV1 et RHDV2. En accord avec le tropisme hépatique du RHDV, nous n'avons pas observé de réplication virale dans les organoïdes intestinaux de lapin. Cette observation souligne l'importance de disposer des organoïdes spécifiques de l'organe ciblé par le pathogène d'intérêt.

Pour expliquer l'origine des lagovirus pathogènes dans les années 80 et l'émergence du RHDV2 en 2010 (Le Gall-Reculé et al. 2013), une hypothèse controversée suggère que les formes pathogènes auraient génétiquement évoluées à partir de lagovirus bénins infectant l'intestin des lapins (Esteves et al. 2015). Il a été récemment proposé que l'étude de ces lagovirus entérotropiques pourrait apporter des éléments de compréhension de la pathogénicité du RHDV. Les travaux de Kardia et al. (2021) ont donc eu pour objectif d'infecter des monocouches de cellules d'organoïdes intestinaux de lapin avec le *Rabbit calicivirus Australia-1* (RCV-A1), un lagovirus entérotropique non pathogène (Strive et al. 2009). Bien que les monocouches de cellules d'organoïdes intestinaux de lapin reproduisent de nombreux aspects du tissu intestinal *in vivo*, le virus n'a pas pu s'y développer, peut être en raison de l'absence des cellules hôtes du virus qui pourraient être les cellules Tuft. L'amélioration de la différenciation cellulaire et l'augmentation de la diversité cellulaire dans ce modèle intestinal pourraient être nécessaires pour parvenir à une infection par ce type de virus.

3.2. Interactions avec le microbiote intestinal

Les organoïdes intestinaux de lapin peuvent également être utilisés pour étudier l'interaction entre le microbiote et l'épithélium intestinal. Par exemple, il est

bien établi que la transition alimentaire du sevrage entraîne une forte modification de la composition et de l'activité métabolique du microbiote intestinal chez le lapin (Beaumont et al. 2022; Paës et al. 2022). Ces changements coïncident avec la maturation de la barrière intestinale mais le rôle du microbiote dans ce processus reste peu connu. Dans ce contexte, une expérimentation a consisté à exposer des organoïdes de caecum de lapin à du surnageant stérile de contenu caecal de lapereaux allaités ou ayant démarré l'ingestion d'aliments solides (Beaumont et al. 2020). Le surnageant stérile de contenu caecal contient l'ensemble des composés solubles et notamment les métabolites produits par le microbiote. Les résultats de cette expérience ont montré que le surnageant du contenu caecal de lapereaux ingérant des aliments solides modifiait l'expression de certains gènes dans les organoïdes de manière similaire à ce qui est observé *in vivo* dans l'épithélium lors de la transition alimentaire du sevrage. Ce résultat suggère donc que les métabolites produits par le microbiote pourraient contribuer à la maturation postnatale de l'épithélium intestinal chez le lapin. Des travaux sont actuellement en cours avec le modèle des monocouches de cellules d'organoïdes de lapin pour identifier les métabolites bactériens capables de renforcer la fonction de barrière. Ces métabolites pourraient être de nouveaux outils nutritionnels pour préserver la santé digestive des lapereaux. Cet exemple illustre l'intérêt des organoïdes pour cribler des composés agissant sur la fonction de barrière de l'intestin.

Conclusion et perspectives

Le développement des organoïdes intestinaux et hépatiques chez le lapin permet aujourd'hui de disposer de modèles cellulaires pour mener des recherches sur l'appareil digestif *in vitro*, ce qui était autrefois limité en raison du manque d'outils disponibles chez cette espèce. Les organoïdes présentent l'avantage d'être dérivés des cellules souches de l'espèce et du tissu d'intérêt, de s'auto-renouveler spontanément sans anomalies génomiques, de s'auto-organiser en 3D pour reproduire en partie la structure de l'organe, d'être composés de multiples types cellulaires et de reproduire certaines des fonctions de l'organe d'intérêt (Beaumont et al. 2021b). L'ensemble de ces caractéristiques permet de mener des expérimentations *in vitro* contribuant à réduire le recours à l'expérimentation animale.

De nombreuses perspectives d'utilisation des modèles d'organoïdes de l'appareil digestif chez le lapin peuvent être envisagées. Les travaux menés chez d'autres espèces indiquent que les organoïdes intestinaux de lapin pourraient être particulièrement adaptés pour étudier la pathogénicité des parasites digestifs tels que les coccidies (Feix et al. 2023). Il pourrait aussi être intéressant d'utiliser les organoïdes intestinaux de lapin pour tenter d'identifier l'agent

infectieux responsable de l'EEL (Licois et al. 2005), par exemple en exposant des organoïdes à des contenus digestifs d'animaux atteints de cette maladie dont l'étiologie reste à comprendre. Les organoïdes digestifs de lapin pourraient aussi être utiles pour comprendre les facteurs génétiques impliqués dans la résistance à des maladies. Pour cela, des organoïdes pourraient être générés à partir de lapins sensibles ou résistants à un pathogène afin d'étudier *in vitro* les mécanismes biologiques sous-jacents à la résistance. Au-delà de l'étude des interactions hôte-pathogènes, les organoïdes intestinaux de lapin sont également des outils adaptés pour réaliser un criblage des effets de composés nutritionnels tels que des probiotiques (Bozzetti and Senger 2022) ou des additifs comme des polyphénols ou acides aminés (Beaumont et al. 2021c).

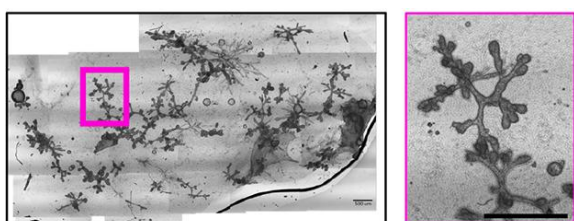


Figure 10 : Observation d'organoïdes de glande mammaire de lapin (Kim et al. 2024). La barre d'échelle représente 500 μ m.

Le développement d'organoïdes de lapin à partir de tissus autres que ceux du système digestif ouvre de nouvelles perspectives. Par exemple, une méthode pour cultiver des organoïdes de glande mammaire de lapin a été décrite pour la première fois en 2024 (Kim et al. 2024). Ces organoïdes reproduisent *in vitro* des structures fonctionnelles de la glande mammaire de lapin, telles que les alvéoles et les lobules (Figure 10). Ces organoïdes pourraient être utiles pour étudier *in vitro* le développement des glandes mammaires chez le lapin. Il pourrait également être utile de développer des méthodes pour cultiver des organoïdes pulmonaires de lapin, comme cela a été fait pour de nombreuses autres espèces (Archer et al. 2021). Ces organoïdes pourraient permettre d'étudier *in vitro* les pathogènes respiratoires du lapin tels que *Pasteurella multocida* qui provoque des rhinites et des pneumonies parfois sévères qui sont responsables de pertes économiques significatives (Wang et al. 2024). Par ailleurs, comme cela a été envisagé pour les maladies respiratoires bovines (Gandhi et al. 2023), il serait intéressant de combiner plusieurs agents pathogènes, tels que *P. multocida*, *Bordetella bronchiseptica* ou encore le virus myxomateux, pour étudier leurs effets combinés sur des modèles d'organoïdes pulmonaires de lapin. Cette approche permettrait de mieux comprendre les interactions complexes entre ces différents pathogènes et leurs impacts sur les voies respiratoires chez le lapin.

De manière globale, les organoïdes développés chez le lapin et chez les autres espèces présentent encore des

limites importantes. En effet, la diversité cellulaire observée *in vivo* n'est pas reproduite en totalité, notamment en ce qui concerne les systèmes immunitaires, nerveux et vasculaires. Par ailleurs, les propriétés physicochimiques des tissus *in vivo* ne sont mimées que partiellement dans les organoïdes. Par exemple, les forces mécaniques exercées sur les cellules dans l'intestin par le transit alimentaire ne sont pas répliquées *in vitro* alors qu'elles sont connues pour jouer un rôle important dans la différenciation cellulaire. Une reconstitution plus fidèle des matrices extracellulaires sera aussi cruciale pour améliorer la pertinence physiologique des organoïdes tout en réduisant le recours aux produits animaux. Le microbiote joue un rôle majeur dans la physiologie de nombreux organes mais les techniques actuelles sont limitées pour co-cultiver des cellules eucaryotes avec une communauté complexe de microorganismes. Les progrès récents dans les technologies de microfabrication et de microfluidique permettent le développement actuel de modèles appelés organes sur puce (Steinway et al. 2020; Cameron et al. 2024). Ces dispositifs composés de compartiments sont particulièrement adaptés pour la co-culture de cellules dérivées d'organoïdes avec des cellules immunitaires ou des microorganismes, dans un environnement mimant les propriétés physicochimiques de l'organe d'intérêt. Ces modèles avancés *in vitro* ont principalement été développés pour les organes murins ou humains et restent à mettre au point pour les autres espèces, y compris le lapin.

Une autre possibilité pour augmenter la diversité cellulaire des organoïdes consiste à utiliser des cellules souches embryonnaires ou des cellules souches pluripotentes induites par modification génétique (iPSC) plutôt que des cellules souches dérivées de tissus comme décrit ci-dessus (Pain 2021). Par exemple, les organoïdes intestinaux dérivés d'iPSC humaines sont composés de cellules épithéliales comme les organoïdes dérivés de cellules souches de cryptes mais contiennent également des cellules du mésenchyme et des cellules endothéliales (Holloway et al. 2020). Ce type d'organoïdes n'a pas encore été développé chez le lapin, mais l'obtention récente d'iPSC chez le lapin ouvrent d'importantes perspectives pour le développement d'organoïdes plus complexes (Perold et al. 2024).

Remerciements

Nous remercions Eloïse Mussard, Corinne Lencina et Sylvie Combes (UMR GenPhySE, Toulouse) ainsi que les personnels de l'installation expérimentale PECTOUL et les plateformes du réseau GENOTOU pour leur contribution au développement des modèles d'organoïdes intestinaux de lapins. Nous remercions également pour leur soutien financier le département INRAE Physiologie Animale et Systèmes d'Élevage (PHASE) et l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-21-CE20-0048, METABOWEAN).

Références

- Alberge J, Mussard E, Al-Ayoubi C, et al (2024) Butyrate reduces epithelial barrier dysfunction induced by the foodborne mycotoxin deoxynivalenol in cell monolayers derived from pig jejunum organoids. *Gut Microbes* 16:2430424. <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2430424>
- Archer F, Bobet-Erny A, Gomes M (2021) State of the art on lung organoids in mammals. *Veterinary Research* 52:77. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00946-6>
- Baquerre C, Montillet G, Pain B (2021) Liver organoids in domestic animals: an expected promise for metabolic studies. *Veterinary Research* 52:47. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00916-y>
- Barker N (2014) Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:19–33. <https://doi.org/10.1038/nrm3721>
- Beaumont M, Blanc F, Cherbuy C, et al (2021a) Intestinal organoids in farm animals. *Vet Res* 52:33. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00909-x>
- Beaumont M, Blanc F, Cherbuy C, et al (2021b) Intestinal organoids in farm animals. *Vet Res* 52:33. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00909-x>
- Beaumont M, Lencina C, Painteaux L, et al (2021c) A mix of functional amino acids and grape polyphenols promotes the growth of piglets, modulates the gut microbiota in vivo and regulates epithelial homeostasis in intestinal organoids. *Amino Acids*. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03082-9>
- Beaumont M, Mussard E, Barilly C, et al (2022) Developmental Stage, Solid Food Introduction, and Suckling Cessation Differentially Influence the Comaturation of the Gut Microbiota and Intestinal Epithelium in Rabbits. *J Nutr* 152:723–736. <https://doi.org/10.1093/jn/nxab411>
- Beaumont M, Paës C, Mussard E, et al (2020) Gut microbiota derived metabolites contribute to intestinal barrier maturation at the suckling-to-weaning transition. *Gut Microbes* 11:1268–1286. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1747335>
- Bevins CL, Salzman NH (2011) Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 9:356–368. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2546>
- Blas C de, Wisewan J (2020) *Nutrition of the Rabbit*, 3rd Edition. CABI
- Bonis V, Rossell C, Gehart H (2021) The Intestinal Epithelium – Fluid Fate and Rigid Structure From Crypt Bottom to Villus Tip. *Front Cell Dev Biol* 9:661931. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.661931>
- Bozzetti V, Senger S (2022) Organoid technologies for the study of intestinal microbiota-host interactions. *Trends Mol Med* 28:290–303. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2022.02.001>
- Cameron O, Neves JF, Gentleman E (2024) Listen to Your Gut: Key Concepts for Bioengineering Advanced Models of the Intestine. *Advanced Science* 11:2302165. <https://doi.org/10.1002/advs.202302165>
- Campana L, Esser H, Huch M, Forbes S (2021) Liver regeneration and inflammation: from fundamental science to clinical applications. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22:608–624. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00373-7>
- Combes S, Fortun-Lamothe L, Cauquil L, Gidenne T (2013) Engineering the rabbit digestive ecosystem to improve digestive health and efficacy. *animal* 7:1429–1439. <https://doi.org/10.1017/S1751731113001079>
- Esteves PJ, Abrantes J, Bertagnoli S, et al (2015) Emergence of Pathogenicity in Lagoviruses: Evolution from Pre-existing Nonpathogenic Strains or through a Species Jump? *PLOS Pathogens* 11:e1005087. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005087>
- Feix AS, Cruz-Bustos T, Rutkowski B, Joachim A (2023) In vitro cultivation methods for coccidian parasite research. *International Journal for Parasitology* 53:477–489. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2022.10.002>
- Gandhi NN, Inzana TJ, Rajagopalan P (2023) Bovine Airway Models: Approaches for Investigating Bovine Respiratory Disease. *ACS Infect Dis* 9:1168–1179. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00618>
- Gerbe F, Legraverend C, Jay P (2012) The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cell Mol Life Sci* 69:2907–2917. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0984-7>
- Gidenne T (2015) Dietary fibres in the nutrition of the growing rabbit and recommendations to preserve digestive health: a review. *animal* 9:227–242. <https://doi.org/10.1017/S1751731114002729>
- Gidenne T, Combes S, Fortun-Lamothe L (2012) Feed intake limitation strategies for the growing rabbit: effect on feeding behaviour, welfare, performance, digestive physiology and health: a review. *animal* 6:1407–1419. <https://doi.org/10.1017/S1751731112000389>
- Grant TD, Specian RD (2001) Epithelial cell dynamics in rabbit cecum and proximal colon P1. *The Anatomical Record* 264:427–437. <https://doi.org/10.1002/ar.1161>
- Gribble FM, Reimann F (2019) Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 15:226–237. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0168-8>
- Günther C, Winner B, Neurath MF, Stappenbeck TS (2022) Organoids in gastrointestinal diseases: from experimental models to clinical translation. *Gut* 71:1892–1908. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-326560>
- Gustafsson JK, Johansson MEV (2022) The role of goblet cells and mucus in intestinal homeostasis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 19:785–803. <https://doi.org/10.1038/s41575-022-00675-x>
- Holloway EM, Wu JH, Czerwinski M, et al (2020) Differentiation of Human Intestinal Organoids

- with Endogenous Vascular Endothelial Cells. *Dev Cell* 54:516-528.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.07.023>
- Kardia E, Fakhri O, Pavy M, et al (2023) Hepatobiliary organoids derived from leporids support the replication of hepatotropic lagoviruses. *Journal of General Virology* 104:001874. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001874>
- Kardia E, Frese M, Smertina E, et al (2021) Culture and differentiation of rabbit intestinal organoids and organoid-derived cell monolayers. *Sci Rep* 11:5401. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84774-w>
- Kim HY, Sinha I, Sears KE, et al (2024) Expanding the evo-devo toolkit: generation of 3D mammary tissue from diverse mammals. *Development* 151:dev202134. <https://doi.org/10.1242/dev.202134>
- König M, Thiel H-J, Meyers G (1998) Detection of Viral Proteins after Infection of Cultured Hepatocytes with Rabbit Hemorrhagic Disease Virus. *J Virol* 72:4492–4497
- Kozłowski MT, Crook CJ, Ku HT (2021) Towards organoid culture without Matrigel. *Commun Biol* 4:1–15. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02910-8>
- Le Gall-Reculé G, Lavazza A, Marchandeau S, et al (2013) Emergence of a new lagovirus related to Rabbit Haemorrhagic Disease Virus. *Veterinary Research* 44:81. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-81>
- Le Gall-Reculé G, Lemaitre E, Bertagnoli S, et al (2017) Large-scale lagovirus disease outbreaks in European brown hares (*Lepus europaeus*) in France caused by RHDV2 strains spatially shared with rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Res* 48:70. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0473-y>
- Licois D, Wyers M, Coudert P (2005) Epizootic Rabbit Enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. *Vet Res* 36:601–613. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005021>
- Malonga T, Vialaneix N, Beaumont M (2024) BEST4+ cells in the intestinal epithelium. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00042.2024>
- Middendorp S, Schneeberger K, Wiegerinck CL, et al (2014) Adult Stem Cells in the Small Intestine Are Intrinsically Programmed with Their Location-Specific Function. *STEM CELLS* 32:1083–1091. <https://doi.org/10.1002/stem.1655>
- Mussard E, Lencina C, Boudry G, et al (2023) Culture of Piglet Intestinal 3D Organoids from Cryopreserved Epithelial Crypts and Establishment of Cell Monolayers. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/64917>
- Mussard E, Lencina C, Gallo L, et al (2022) The phenotype of the gut region is more stably retained than developmental stage in piglet intestinal organoids. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10: <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.780924>
- Mussard E, Pouzet C, Helies V, et al (2020) Culture of rabbit caecum organoids by reconstituting the intestinal stem cell niche *in vitro* with pharmacological inhibitors or L-WRN conditioned medium. *Stem Cell Research* 48:101980. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101980>
- Paës C, Gidenne T, Bébin K, et al (2023) L'introduction précoce d'aliment solide au début de la vie, une stratégie de pilotage du microbiote pour construire et préserver la santé du lapin. *INRAE Productions Animales* 36:7731–7731. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2023.36.3.7731>
- Paës C, Gidenne T, Bébin K, et al (2022) Early Introduction of Plant Polysaccharides Drives the Establishment of Rabbit Gut Bacterial Ecosystems and the Acquisition of Microbial Functions. *mSystems* e0024322. <https://doi.org/10.1128/msystems.00243-22>
- Pain B (2021) Organoids in domestic animals: with which stem cells? *Veterinary Research* 52:38. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00911-3>
- Perold F, Pham H-T, Pijoff Y, et al (2024) Generation of Systemic Chimeras via Rabbit Induced Pluripotent Stem Cells Reprogrammed with KLF2, ERAS, and PRMT6
- Ramachandran P, Matchett KP, Dobie R, et al (2020) Single-cell technologies in hepatology: new insights into liver biology and disease pathogenesis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17:457–472. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0304-x>
- Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459:262–265. <https://doi.org/10.1038/nature07935>
- Smith IL, Huang N, Pavy M, et al (2025) No evidence of rabbit haemorrhagic disease virus 2 infection in scavengers of wild rabbits in Australia. *Wildl Res* 52:. <https://doi.org/10.1071/WR24122>
- Steinway SN, Saleh J, Koo B-K, et al (2020) Human Microphysiological Models of Intestinal Tissue and Gut Microbiome. *Front Bioeng Biotechnol* 8:. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00725>
- Strive T, Wright JD, Robinson AJ (2009) Identification and partial characterisation of a new lagovirus in Australian wild rabbits. *Virology* 384:97–105. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.004>
- Wang J, Sun S, Chen D, et al (2024) Pathogenic and genomic characterization of rabbit-sourced *Pasteurella multocida* serogroup F isolates recovered from dead rabbits with respiratory disease. *Microbiol Spectr* 12:e0365423. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03654-23>
- Zhu J, Miao Q, Tan Y, et al (2017) Inclusion of an Arg-Gly-Asp receptor-recognition motif into the capsid protein of rabbit hemorrhagic disease virus enables culture of the virus in vitro. *J Biol Chem* 292:8605–8615. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.780924>