

# Les sérotypes de *Salmonella* induisent différentes interactions cellulaires et moléculaires avec les cellules épithéliales intestinales porcines IPEC-1

Mustapha BERRI (1), Michel OLIVIER (1), Claire CHEVALEYRE (1), Sandrine MELO (1), Sylvie ROCHE (1), Philippe VELGE (1),  
Isabelle VIRLOGEUX-PAYANT (1), François MEURENS (2)

(1) ISP, INRA, Université François Rabelais de Tours, UMR 1282, 37380 Nouzilly, France

(2) ONIRIS, ENV Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique, site de la Chantrerie, 44307 Nantes cedex 03  
mberri@tours.inra.fr

## Different cellular and molecular interactions with porcine intestinal epithelial cells IPEC-1 according to *Salmonella* serotype

The ability of *Salmonella* serotypes to infect orally a given host and induce pathology relies on their cellular and molecular interactions with the intestinal epithelium. In pigs, the serotype *S. Choleraesuis* induces septicemia while *S. Typhimurium* induces gastroenteritis or an asymptomatic carrier state of the bacteria. *S. Typhisuis*, a serovar rarely studied, is able to cause hemorrhagic diarrhea and colon inflammation. An *in vitro* approach was used to establish a correlation between the capacity of different *Salmonella* serotypes to adhere, invade and induce an immune response depending on the porcine intestinal epithelial cells IPEC-1. To this end, *S. Choleraesuis*, *S. Typhimurium* and *S. Typhisuis* were evaluated using this *in vitro* cellular model in comparison with *S. Dublin* and *S. Gallinarum*, two host-specific of cattle and poultry respectively. We have shown that with *S. Typhimurium* and *S. Choleraesuis*, the invasion percentage of non-polarized IPEC-1 cells was higher than that obtained with *S. Typhisuis*, *S. Dublin* or *S. Gallinarum*. In contrast, *S. Typhisuis* invaded successfully polarized IPEC-1 cells as well as *S. Choleraesuis* and *S. Typhimurium* but unlike *S. Gallinarum* or *S. Dublin*. The analysis of the immune response induction, using RT-qPCR, showed a significant increase of inflammatory cytokine expression such as IL-8, TNF $\alpha$ , IL1 $\alpha$  or IL1 $\beta$ , CCL20 and CCL25 chemokines and TLR4 receptor in polarized IPEC-1 cells infected with *S. Typhimurium* and *S. Typhisuis* serotypes. Comparatively, *S. Choleraesuis* infection did not induce any change in the expression of these mediators. Thus, the first cell interaction steps with polarized IPEC-1 are able to distinguish serotypes based on their target species whereas induction of the immune response would differentiate a pig's serotypes according to their pathogenesis.

## INTRODUCTION

Les infections à *Salmonella* constituent un problème majeur pour l'industrie porcine et la santé publique, car cet animal est un réservoir pour les infections chez l'homme. Le rapport européen sur l'analyse quantitative des risques microbiologiques estime que 10 à 20% des cas diagnostiqués de salmonellose chez l'humain en Europe sont associés à la consommation de viande de porc contaminée. *S. Typhimurium* est le serotype plus fréquemment isolé dans ce cas. Ce serotype est associé, chez le porc, avec une maladie entérique ou un portage asymptomatique de la bactérie. Les sérovars *S. Choleraesuis* et *S. Typhisuis* se sont adaptés spécifiquement au porc et provoquent chez cette espèce respectivement une septicémie ou des diarrhées hémorragiques et une inflammation du colon (Boyer et al. 2008). La lutte contre les salmonelles est essentiellement basée sur l'utilisation des antibiotiques qui contrôlent les signes cliniques de la maladie. Cependant, l'utilisation de l'antibiothérapie ne modifie pas la durée et le niveau d'excrétion des salmonelles dans l'environnement de l'élevage et favorise l'émergence de souches résistantes. Il est donc important de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en œuvre au cours de l'interaction des salmonelles avec son hôte afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et/ou prophylactiques. Pour cela, une approche *in vitro* de culture de cellules épithéliales intestinales porcines IPEC-1 non polarisées ou polarisées a été

utilisée dans le but d'établir une corrélation entre la capacité d'invasion et d'induction de la réponse immunitaire en fonction du sérotype de *Salmonella*.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Agents pathogènes étudiés

Plusieurs sérotypes de *Salmonella* ont été utilisés : *S. Dublin* est adapté aux bovins, *S. Gallinarum* aux volailles alors que *S. Choleraesuis* et *S. Typhisuis* se sont adaptés à l'espèce porcine. En revanche, *S. Typhimurium* possède un large spectre d'hôtes car elle infecte l'Homme et divers animaux y compris le porc. Ces souches sont issues d'une collection de salmonelles disponible à l'unité UMR ISP 1282 de l'INRA Centre Val de Loire. Elles ont été conservées dans 25% de glycérol à -80°C jusqu'à utilisation.

### 1.2. Infection des cellules épithéliales intestinales IPEC-1

Pour évaluer la capacité d'adhésion des bactéries, le milieu de culture est enlevé et les cellules sont infectées, à une multiplicité d'infection (MOI) de 10:1 en déposant 300  $\mu$ L de suspension bactérienne contenant  $4.10^6$  micro-organismes par puits pendant 30 minutes à 37°C avant de subir six lavages. Le pouvoir invasif est évalué après une incubation de 30 minutes à 37°C suivie de l'addition de 100  $\mu$ g de gentamicine pendant 90 minutes supplémentaires. Les taux d'adhésion et

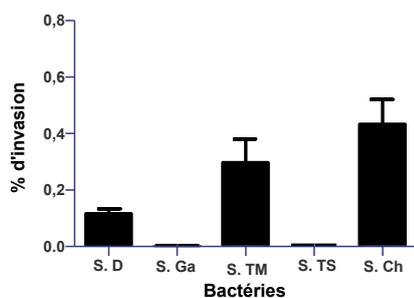
d'invasion ont été estimés par dénombrement bactérien sur gélose de milieu TSA par rapport à l'inoculum initial.

### 1.3. Analyse de la réponse immunitaire par RT-qPCR

L'infection des cellules IPEC-1 non polarisées et polarisées est réalisée dans les mêmes conditions que le test d'invasion décrit précédemment en présence 100 µg de gentamicine. L'extraction et la purification des ARN sont réalisées en utilisant le kit Rneasy Minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France), puis retro-transcrits en ADN complémentaire. L'expression de 20 gènes incluant des cytokines de la voie Th1, Th2, Th17 et Treg, des gènes codant pour des chimiokines, des mucines, des peptides antimicrobiens et des récepteurs membranaires (TLR et NOD) a été évaluée par RT-qPCR par la méthode de quantification relative  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

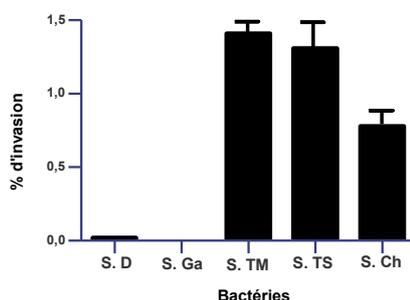
## 2. RESULTATS

Les résultats obtenus montrent une capacité d'adhésion et d'invasion variable entre les souches testées. *S. Typhimurium* et *S. Choleraesuis* présentent un pourcentage d'invasion plus élevé que celui obtenu avec les autres souches testées. *S. Typhisuis* ne présente aucune capacité d'invasion des IPEC-1 non polarisées comme *S. Gallinarum* (Figure 1).



**Figure 1** – Invasion des cellules IPEC-1 non polarisées par différents sérotypes de *Salmonella*. S.D (*S. Dublin*), S.Ga (*S. Gallinarum*), S.TM (*S. Typhimurium*), S.TS (*S. Typhisuis*), S.Ch (*S. Choleraesuis*).

En revanche, l'utilisation du modèle des IPEC-1 polarisées a montré des pourcentages d'invasion des bactéries *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis* et *S. Typhisuis* plus élevés que ceux observés avec les IPEC-1 non polarisées.



**Figure 2** – Invasion des cellules IPEC-1 polarisées par différents sérotypes de *Salmonella*. S.D (*S. Dublin*), S.Ga (*S. Gallinarum*), S.TM (*S. Typhimurium*), S.TS (*S. Typhisuis*), S.Ch (*S. Choleraesuis*).

De plus, ce modèle a montré que *S. Typhisuis* est aussi invasive que *S. Choleraesuis* et *S. Typhimurium*, ce qui n'est pas le cas de *S. Dublin* ou *S. Gallinarum* (Figure 2).

L'expression de différents médiateurs immunologiques impliqués dans la réponse immunitaire cellulaire et humorale a été évaluée par PCR quantitative en temps réel. L'analyse de l'expression de la réponse immunitaire induite par des cellules IPEC-1 non polarisées n'a pas montré de variations d'expression et n'a donc pas permis de différencier les sérotypes entre eux. En revanche, l'analyse de l'induction de la réponse immunitaire par ces différents sérotypes a montré une augmentation importante de l'expression des cytokines d'inflammation IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , IL1 $\alpha$  et GM-CSF, des chimiokines CCL20 et CCL25, la mucine MUC1 ainsi que du récepteur TLR4 par les IPEC-1 polarisées en présence des sérotypes *S. Typhimurium* et *S. Typhisuis*. Comparativement, *S. Choleraesuis* n'a pas induit l'expression de ces médiateurs comme *S. Dublin* ou *S. Gallinarum* (Table 1). Ces résultats ont donc permis de différencier les sérotypes porcins en fonction de leur pathogénie.

**Tableau 1** – Degré de stimulation de l'expression des médiateurs de l'immunité suite à l'infection des cellules IPEC-1 polarisées par différents sérotypes de *Salmonella*. S.D (*S. Dublin*), S.Ga (*S. Gallinarum*), S.TM (*S. Typhimurium*), S.TS (*S. Typhisuis*), S.Ch (*S. Choleraesuis*).

Marqueurs Immunitaires	Sérotypes				
	S.D	S.Ga	S.TM	S.TS	S.Ch
IL-6	2,50	2,09	6,19	4,43	1,34
IL-8	14,10	4,95	65,73	94,44	10,95
TNF $\alpha$	10,16	3,59	29,57	84,48	4,32
IL 1 $\alpha$	9,15	4,63	30,66	47,05	8,22
GM-CSF	14,89	2,76	23,78	20,64	5,58
CCL20	17,30	3,18	103,30	136,90	11,46
CCL25	4,35	2,98	5,39	8,07	2,00
MUC1	6,60	1,81	12,28	23,12	2,56
TLR4	3,07	2,66	4,84	2,60	1,56

## CONCLUSION

Ces données *in vitro* montrent que les premières étapes d'interactions cellulaires entre *Salmonella* et la cellule épithéliale intestinale permettent de discriminer les sérotypes capables d'infecter le porc par rapport aux autres sérotypes infectant d'autres espèces animales, mais ne permettent pas de différencier les sérotypes infectant l'espèce porcine. La spécificité de l'hôte et la nature de la pathologie induite chez le porc seraient liées aux différentes voies d'entrée utilisées par chaque sérotype pour infecter son hôte, à savoir les cellules M, les cellules épithéliales ou les cellules dendritiques sous-jacentes. En revanche, l'analyse de la réponse immunitaire induite au cours de l'infection a montré que *S. Choleraesuis*, le sérotype provoquant des infections systémiques et des septicémies chez le porc n'induit pas d'expression des médiateurs de l'immunité intestinale contrairement à *S. Typhimurium* et *S. Typhisuis*. Ceci pourrait présenter une stratégie d'évitement, d'évasion ou de subversion de l'immunité pour infecter et persister dans l'organisme hôte.

## REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- Boyen F., Haesebrouck F., Maes D., Van Immerseel F., Ducatelle R., Pasmans F. (2008). Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: A closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Vet. Microbiol.* 130, 1–19.