

Cellules épithéliales du colostrum de truie

Sensibilité au virus GET et propriétés in vitro

C. LE JAN (1), Claire CHEVALEYRE (1)

(1) Institut National de la Recherche Agronomique
Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie, 37380 Nouzilly

Cellules épithéliales du colostrum de truie : sensibilité au virus GET et propriétés in vitro

Le colostrum de truie contient 1 à 2,5. 10⁶ cellules par ml, dont 20 à 40% de cellules épithéliales peu différenciées. Nous avons établi que ces cellules se multiplient in vitro, arrivant à confluence en 5-7 jours au premier passage, et se maintiennent sur 3 à 4 passages en cultures pures (caractérisées par leurs cytokératines intracytoplasmiques). Elles se différencient en cellules produisant de l'alpha-lactalbumine en milieu enrichi en sérum de truie allaitante ou en extrait aqueux de colostrum. Infectées in vitro par une souche sauvage (Purdue) ou atténuée (Nouzilly) du coronavirus de la Gastroentérite transmissible (GET), ces cellules: (i) expriment les antigènes viraux; (ii) produisent du virus GET infectieux pour les cellules colostrales et des cellules de lignée testiculaire de porc (ST). Nous concluons: (i) à la sensibilité des cellules mammaires de la truie au virus GET; (ii) à l'intérêt de la cellule épithéliale colostrale comme outil pour l'étude de l'immunité lactogène; (iii) à la possibilité que les cellules colostrales maternelles présentent des antigènes à l'intestin néonatal.

Epithelial cells from sow colostrum : sensivity to GTE virus and in vitro properties

Sow colostrum contains 1 to 2,5. 10⁶ cells per ml, with 20 to 40% of poorly differentiated epithelial cells. We have established that these cells divide in vitro, with confluent monolayers in 5-7 days in primary cultures, and that subcultures of pure epithelial cells, characterized by their intracytoplasmic cyokeratins, can be obtained for 3 to 4 passages. They differentiate in alpha-lactalbumin producing cells in medium enriched with lactating sow serum or colostrum aqueous extract. When infected with wild (Purdue) or attenuated (Nouzilly) strains of the coronavirus of Transmissible gastroenteritis (GET), these cells: (i) express viral antigens; (i) produce GET virus infectious for swine testicular cell line (ST) and colostrum cells. We conclude: (i) to the sensitivity of sow mammary epithelial cells to GET virus; (ii) to the interest of colostrum epithelial cell as a tool for lactogenic immunity studies; (iii) to the hypothesis that colostrum epithelial cells could present antigens to newborn piglet intestine.

INTRODUCTION

Les sécrétions mammaires contiennent des cellules maternelles. Si leurs fonctions ne sont pas encore établies, leur intérêt biologique pour le mammifère nouveau-né est fortement suggéré par les caractères phénotypiques de ces cellules, traduisant une sélection en cellules à mémoire (BERTOTTO et al, 1990), et les données sur la transmission d'immunité cellulaire par les sécrétions mammaires. Chez la truie, la teneur du colostrum en cellules est de 1 à 2,5 10⁶/ml, avec une prédominance de lymphocytes T et de petites cellules épithéliales peu différenciées (EVANS et al, 1982; LE JAN, 1993). Après ingestion du colostrum, les cellules maternelles passent la barrière intestinale, par un mécanisme qui met en jeu une reconnaissance sélective, et gagnent la muqueuse intestinale, les ganglions mésentériques, le sang et la rate (TUBOLY et al, 1988 ; WILLIAMS, 1993). La zone préférentielle d'absorption des cellules colostrales est la muqueuse duodénale (LE JAN et al, 1995). En raison du type de placentation épithéliochoriale dans l'espèce porcine, l'épithélium intestinal néonatal est l'interface où se produit le premier contact entre cellules de la mère et organisme du porcelet. L'épithélium intestinal du porcelet nouveau-né présente une expression réduite d'antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (LE JAN et CHEVALEYRE, 1995), qui traduit un état de maturation incomplète pouvant intervenir dans l'acceptation des cellules semi-allogéniques du colostrum maternel. Nous rendons compte de la mise en évidence *in vitro* de propriétés des cellules épithéliales du colostrum de truie qui nous conduisent à envisager que, parallèlement aux lymphocytes T du colostrum, elles peuvent avoir un rôle biologique chez le porcelet nouveau-né.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Culture des cellules colostrales

Le colostrum est prélevé sur truies Minipig histocompatibles (haplotype d/d) par traite manuelle, après inoculation intramusculaire d'ocytocine; les cellules, préparées par 3 lavages et centrifugations, sont mises en culture en milieu RPMI additionné de 10% de sérum de veau foetal, L-glutamine, pyruvate de sodium et antibiotiques. Les supports de culture sont des boîtes Costar à 6 puits (référence 3406) et des microplaques Falcon à 96 cupules (référence 3072), sans addition de collagène. Pour les sous-cultures, les tapis cellulaires sont traités en trypsine-versène. Pour certaines expériences, le milieu de culture est additionné soit de 10% de sérum de truie allaitante soit de 5% de phase liquide de colostrum, préalablement chauffés 30' à 56°C.

1.2. Infections virales

Les cultures de cellules colostrales, au 2nd et 3^{ème} passage, sont infectées par les souches Purdue (pathogène) ou Nouzilly (atténuée) du coronavirus de la gastroentérite transmissible (GET). Les tapis cellulaires sont fixés à différents temps pour la mise en évidence de l'expression d'anti-

gènes viraux. Pour la recherche de virus infectieux, les boîtes de culture infectées sont congelées lorsque la lyse du tapis cellulaire atteint 75%, et les suspensions virales récoltées éprouvées sur cellules de lignée testiculaire de porc (lignée ST) et sur cellules de colostrum au 2nd passage.

1.3. Immunocytochimie pour la mise en évidence de cytokératines intracellulaires, d'alphalactalbumine et d'antigènes viraux

Les anticorps suivants ont été utilisés: le clone K.8.13 (Sigma), anticorps monoclonal dirigé contre les cytokératines bovines et reconnaissant les cytokératines porcines ; le polyclonal anti-lactalbumine humaine (Sigma, L-0888) ; un mélange de monoclonaux anti-protéines E1, E2 et NP du virus GET. La fixation de l'anticorps primaire est révélée par réaction colorée (Fast red) après addition d'Ig de lapin anti-Ig de souris, et d'un complexe Ig de souris anti-phosphatase alcaline/phosphatase alcaline (APAAP), ou par immunomarquage streptavine-peroxydase (kit universel, Immunotech).

2. RÉSULTATS

2.1. Évolution et caractérisation des cellules colostrales en culture

En culture primaire, des foyers de multiplication cellulaire se développent 24 à 48 heures après la mise en culture, et arrivent à confluence en 5 à 7 jours. Lors des second et troisième passages, la confluence est obtenue en 3 à 5 jours. Les passages ultérieurs (4^{ème} et 5^{ème}) se traduisent par un net ralentissement du développement des cultures cellulaires. L'ensemble des cellules présente des cytokératines intracytoplasmiques, ce qui les définit comme cellules épithéliales.

2.2. Différentiation des cellules épithéliales en culture

Le critère de différenciation en cellules sécrétantes que nous utilisons est la production d'alphalactalbumine, détectée par immunocytologie. En milieu de base (RPMI 10 % sérum de veau foetal), les cellules en culture ne produisent pas d'alphalactalbumine. En milieu additionné de sérum de truie allaitante ou d'extrait liquide de colostrum, on note des foyers de différenciation cellulaire, avec présence d'alphalactalbumine intracytoplasmique.

2.3. Sensibilité au virus GET

Les cultures infectées au 2nd et 3^{ème} passage par le virus GET (souche Purdue et souche Nouzilly) présentent des lésions, qui apparaissent macroscopiquement au second jour de l'infection et provoquent la lyse du tapis en 3 à 5 jours. Les antigènes du virus GET sont mis en évidence dans les cellules à partir du second jour de l'infection *in vitro*.

Les surnageants des cultures infectées sont infectieux pour

les cellules de colostrum de truie, et pour les cellules de lignée ST.

3. CONCLUSION

Comme chez le bovin (BUEHRING, 1990) et l'homme (TAYLOR-PAPADIMITRIOU et STAMPFER, 1991), le colostrum de truie contient des cellules épithéliales d'origine mammaire aptes à se multiplier *in vitro*. La sécrétion colostrale débute alors que la glande mammaire est encore en phase de reconstruction architecturale. Plus tardivement, dans le lait de truie, les cellules épithéliales ne se multiplient pas *in vitro*, et l'on obtient en culture un développement de cellules de type fibroblastique (LE JAN, 1993). Nous avons mis en évidence certaines caractéristiques des cellules épithéliales colostrales en culture. Elles se multiplient *in vitro* sur plus de trois passages en cultures pures, sans contamination fibroblastique; ceci permet de les utiliser pour l'obtention de lignées immortalisées de cellules épithéliales mammaires porcines. Leur origine: tubaire ou alvéolaire, n'est pas établie, mais en milieu enrichi (sérum de truie allaitante ou phase aqueuse de colostrum), une partie d'entre elles se différencie en cellules à caractères de cellules alvéolaires sécrétantes (production d'alpha-lactalbumine). Ces cellules sont sensibles, *in vitro*, au virus de la GET: expression d'antigènes viraux, lyse cellulaire, production de virus infectieux pour les cellules colostrales et des cellules porcines de lignée (ST). Nous concluons que les cellules épithéliales du

colostrum, par les possibilités qu'elles offrent de cultures primaires ou de lignée après immortalisation, sont un outil pour l'étude de l'immunité lactogène chez le porc: translocation des IgA sécrétoires ; traitement des antigènes ; production de cytokines, comme cela a été montré chez l'homme (PALKOWETZ et al, 1994). D'autre part, le fait que le porcelet reçoive par le colostrum des cellules épithéliales peu différenciées, aptes *in vitro* à se multiplier, se différencier et exprimer des antigènes viraux, nous amène à envisager les rôles possibles de ces cellules pour le porcelet nouveau-né : (i) production de cytokines dans la muqueuse intestinale néonatale; (ii) nous posons l'hypothèse de la présentation à l'intestin néonatal d'antigènes traités dans la glande mammaire par les cellules maternelles. La cellule épithéliale colostrale pourrait, après internalisation dans la glande mammaire d'antigènes viraux ou inertes - par les complexes antigène-IgA-composant sécrétoire-, les présenter à la muqueuse néonatale, immature et vierge de contacts antigéniques. Un rôle possible de la cellule épithéliale colostrale, et qui s'il est confirmé serait important pour le devenir du porcelet, pourrait être la stimulation antigénique locale du porcelet et l'orientation de ses réponses immunitaires locales.

REMERCIEMENTS

Nous remercions P. LECHOPIER, P. BERNARDET, D. MUSSET et R.DELAUNAY de l'Unité Expérimentale pour la collecte des prélèvements biologiques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BERTOTTO A., GERLI R., FABIETTI G., GRUPI S., ARCANGELI C., SCALISE F., VACCARO R., 1990. Eur. J. Immunol., 20, 1877-1880.
- BUEHRING G.C., 1990. J. Dairy Sci., 73 (4), 956-963.
- EVANS P.A., NEWBY T.J., STOKES C.R., BOURNE F.J., 1982. Vet. Immunol. Immunopathol., 3, 515-527.
- LE JAN C., 1993. Res. Vet. Sci., 57, 300-304.
- LE JAN C., LE DIVIDICH J., CHEVALEYRE C., HULIN J.C., 1995. Journées Rech. Porcine en France, 27, 91-96.
- LE JAN C., CHEVALEYRE C., 1995. Vet. Immunol. Immunopathol. (in press).
- PALKOWETZ K.H., ROYER C.L., GAROFALO R., RUDLOFF H.E., SCHMALSTIEG F.C., GOLDMAN A.S., 1994. J. Reprod. Immunol., 26 (1), 57-64.
- TAYLOR-PAPADIMITRIOU J., STAMPFER M.R., 1991. In : Culture of epithelial cells. Ed. R. Ian Freshney. New York/Chichester. Wiley-Liss, pp. 107-133
- TUBOLY S., BERNATH S., GLAVITS R., MEDVECZY I., 1988. Vet. Immunol. Immunopathol., 20, 75-85.
- WILLIAMS P.P., 1993. Can. J. Vet. Res., 57, 1-8.