

# Quantification de cytokines pro-inflammatoires sécrétées par une lignée intestinale porcine

Emilia BENASSAI (1), Nusrat ALI (2), Emma FORTIER (2), Eva DUPUIS (1), Tristan CHALVON-DEMERSAY (1),  
Edouard COUDERT (1)

(1) Centre Mondial de l'Innovation (CMI) Roullier, Nutrition Animale et Environnement, 18 av. Franklin Roosevelt,  
35400 Saint-Malo, France

(2) Centre Mondial de l'Innovation (CMI) Roullier, Sciences Physico-Chimiques et Bio-Analytiques,  
18 av. Franklin Roosevelt, 35400 Saint-Malo, France

[emilia.benassai@roullier.com](mailto:emilia.benassai@roullier.com)

## Quantification of secreted pro-inflammatory cytokines in an *in vitro* leaky gut model using an intestinal porcine cell line

Inflammatory enteropathies in pigs represent a major health issue that decrease nutrient absorption capacity and immune defence against pathogens. Using *in vitro* models of the intestinal barrier with challenged permeability, this study aimed at comparing techniques for quantifying pro-inflammatory proteins secreted by endothelial cells to allow more precise analyses adaptable to other porcine *in vitro* and *in vivo* models. The model developed uses the porcine intestinal cell line IPEC-J2, differentiated on semi-permeable inserts for 6 days, and then treated with pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  (60 ng/mL) and IL-1 $\beta$  (60 ng/mL) for 24 hours. This treatment simulates the decrease in intestinal integrity associated with inflammatory disorders *in vivo*. The parameters studied included trans-epithelial electrical resistance (TEER) and Elisa and multiplex techniques implemented to quantify levels of pro-inflammatory cytokines in the basal medium. Statistical significance of the results was assessed using analysis of variance followed by Tukey's post-hoc tests. The results showed a significant reduction in expression of barrier-function proteins after treatment, consistent with TEER observations. Elisa and multiplex techniques demonstrated agreement in measuring levels of IL-8 and IL-6 cytokines, reinforcing the reliability of the results. Two quantification techniques were applied to a permeable intestine model, providing analysis possibilities for pro-inflammatory proteins secreted from the basolateral part of endothelial cells. This model, adaptable to other complex porcine models (including organoids), could be used to select new nutritional active ingredients for improving animal health and welfare.

## INTRODUCTION

Les entéropathies inflammatoires chez les porcs représentent un défi sanitaire majeur, impactant non seulement la capacité d'absorption des nutriments mais aussi la défense immunitaire contre les pathogènes. Ces affections entraînent 20-40% de profit non réalisé dans les élevages porcins (Szabó *et al.*, 2023). La compréhension des mécanismes liés à l'inflammation intestinale et à la dysfonction de la barrière intestinale est cruciale pour développer des solutions efficaces. Dans ce contexte, les modèles *in vitro* sont de précieux outils pour étudier les réponses cellulaires à divers stimuli inflammatoires. Cette étude porte sur l'utilisation de la lignée de cellules intestinales porcines IPEC-J2, afin de simuler les effets des cytokines pro-inflammatoires sur la fonction de barrière intestinale. En se basant sur des modèles existant chez l'humain (Hartwig *et al.*, 2022) et le porc (Xiao *et al.*, 2020), nous avons reproduit un modèle *in vitro* d'intestin perméable. L'objectif est de comparer les techniques Elisa et multiplex pour quantifier les protéines pro-inflammatoires sécrétées par les cellules épithéliales

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. Culture cellulaire

Les cellules IPEC-J2 (DSMZ) sont entretenues dans un milieu DMEM/Ham's F12 (1:1, Gibco) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 1 % de solution antibiotique et antimycotique et 1,5 % HEPES (Dominique DUTSCHER SAS). Le milieu est renouvelé tous les deux jours et les cellules sont incubées à 37°C avec un taux de 5 % de CO<sub>2</sub>.

### 1.2. Modèle d'intestin perméable

4.10<sup>6</sup> cellules IPEC-J2 sont ensemencées dans chaque puit des inserts semi-perméables de PET avec une porosité de 0,4  $\mu$ m (Thincert™, Greiner Bio-One) et incubées pendant 6 jours pour permettre la formation d'une monocouche adhérente et non-complètement différenciée. La différenciation incomplète a été préalablement évaluée par mesures de résistance transépithéliale (TEER) au jour 6 et aux jours 9 et 13 de culture sur insert (TEER<sub>j6</sub> = 4780  $\Omega$ ·cm<sup>2</sup>, TEER<sub>j9,j13</sub> = 8152-9145  $\Omega$ ·cm<sup>2</sup>). L'inflammation est induite du côté basal par un traitement de 24h avec TNF- $\alpha$  (60 ng/mL), IL1- $\beta$  (60 ng/mL) dans un milieu non-supplémenté en SVF, avec six répétitions pour les modalités témoin et traité. L'intégrité de la monocouche cellulaire a été monitorée par mesure de TEER et par analyse de l'expression génique (q-PCR) des marqueurs d'intégrité