THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Infectiologie, Physipoathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

---

Présentée et soutenue par :

Mme ELOÏSE MUSSARD

le mardi 27 juin 2023

Titre :

Développement et caractérisation d'un modèle d'organoïdes d'intestin de porcelets pour étudier les effets de postbiotiques sur l'épithélium intestinal

---

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Génétique, Physiologie et Systèmes d'Elevage (GENPHYSE)

Directeur(s) de Thèse :

MME SYLVIE COMBES

M. MARTIN BEAUMONT

Rapporteurs :

MME FABIENNE ARCHER, INRA LYON

MME SOPHIE THENET, CENTRE DE RECHERCHE SAINT ANTOINE

Membre(s) du jury :

MME VASSILIA THEODOROU, INRA TOULOUSE, Président

M. MAXIME MAHE, INSERM NANTES, Membre

MME CAROLINE ACHARD, ENTREPRISE LALLEMAND SAS, Invité(e)

MME SYLVIE COMBES, INRA TOULOUSE, Membre

Remerciements

Me voilà arrivée au terme de cette expérience qu'est la thèse de laquelle je ressors grandie. Ce manuscrit est l'aboutissement de trois années inoubliables et enrichissantes sur le plan professionnel mais aussi personnel.

Je tiens tout d'abord à remercier Fabienne Archer et Sophie Thenet d'avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteures de cette thèse, ainsi que Maxime Mahé pour avoir accepté d'en être l'examinateur.

Merci aux membres de mon comité de thèse, Laura Soler-Vasco, Gaëlle Boudry et Nathalie Vergnolle, pour leurs conseils, leur aide et tous les échanges que nous avons pu avoir au cours des comités de suivi individuel.

Je souhaite remercier mes deux directeurs de thèse, Martin Beaumont et Sylvie Combes, pour m'avoir fait confiance pour réaliser cette thèse. Merci à Martin pour son engagement, son encadrement quotidien et sa disponibilité au cours de ces trois années de thèse. Merci à Sylvie pour ses conseils avisés, son soutien et sa disponibilité au cours de cette thèse.

Je souhaite remercier Juliette Riquet (directrice d'unité) de m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de l'UMR GenPhySE de l'INRAE d'Auzeville-Tolosane dans les meilleures conditions. Je souhaite remercier l'entreprise Lallemand de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse CIFRE. Je remercie particulièrement Caroline Achard et Emmanuelle Apper pour avoir suivi l'avancement de la thèse. Je remercie également l'Institut Carnot France Futur Elevage pour le financement du projet "OrganoPig" dans lequel s'est inscrit ma thèse.

Je tiens à remercier l'UMR INRAE Toxalim, et plus particulièrement Laura Soler-Vasco, Phillipe Pinton et Mickael Albin qui se sont mobilisés pour permettre le prélèvement des différents échantillons nécessaires à la mise en place du projet. Merci à Laura et Phillipe pour leur collaboration et le partage de connaissance sur la mycotoxine DON.

Merci à l'école doctorale SEVAB et particulièrement à Dominique Pantalacci pour sa disponibilité et son aide pour toutes les démarches administratives de la thèse. Merci à l'école internationale de recherche d'Agreenium (EIR-A) pour la labellisation de ma thèse.

Je remercie sincèrement l'équipe allemande FG16 « Agents mycotiques, parasitaires et mycobactéries » de l'institut Robert Koch de m'avoir accueillie pendant trois mois. Je remercie plus particulièrement Christian Klotz et Antonia Müller pour leur encadrement, leur aide et leurs conseils pour la culture en monocouches des cellules d'organoïdes. Merci également à Gudrun K., Joël M., Estefania D-B., David W., Sebastian R. et Silvio B. pour leur participation au projet au cours de mon séjour dans l'équipe.



Un grand merci à l'équipe NED de m'avoir accueillie pendant ces trois années de thèse. Merci à Corinne pour son aide précieuse en culture cellulaire. Merci à Céline, Lise et Julie pour leur participation aux différentes parties expérimentales du projet de thèse. Merci à Carole pour sa disponibilité face à mes différentes questions sur la gestion des déchets chimiques. Merci à Laurent pour son aide en statistiques, sur l'utilisation de R studio, l'écriture de scripts, la manipulation de tableaux, la création de figures, … Merci à Géraldine pour son expertise dans l'analyse du microbiote et ses conseils. Merci à Christelle pour ses conseils et son écoute. Merci à l'ensemble de l'équipe et des stagiaires pour les différents moments de convivialité lors des repas à la cantine et pauses café. Je remercie également Nancy, Manuela, Evelyne, Valérie L, Valérie G et Catherine pour leur aide dans les différentes démarches administratives. Merci à Manuela et Nancy pour les bons moments passés en salle café.

Je remercie mes co-bureau doctorantes Cécile, Manon F., Mathilde et Tania pour leur bonne humeur et leur soutien, ainsi que tous ceux qui ont pu séjourner dans ce bureau. Bon courage à Mathilde et Tania pour la suite de leur thèse. Je remercie également Charlotte, avec qui j'ai pu partager le bureau, pour son soutien avant et au cours de la thèse. Merci à tous les doctorants, stagiaires, non-permanents, Vanille, Audrey, Quentin, Océane, Vincent, Riccardo, Maya, Julien G., Coralie, … pour avoir animé les pauses café avec leur bonne humeur !

Je tiens également à remercier l'association La Parenthèse-Occitanie et plus particulièrement l'ensemble des doctorants engagés dans l'association. Merci pour l'organisation des journées de rédaction mais aussi du séjour de rédaction. Merci aux doctorants que j'ai pu croiser lors de ces journées et du séjour pour l'entraide, le partage d'expérience, chacun dans son domaine spécifique, le soutien et toutes nos discussions.



Je remercie aussi tous ceux que j'ai croisé plus rapidement et qui ont contribué à rendre la poursuite de cette thèse si agréable. Merci à ce petit groupe de Salsa très accueillant, détendu et fun qui a ensoleillé mes vendredis soirs au cours de la rédaction de ce manuscrit !

Merci à Christelle pour toutes nos discussions et de m'avoir embarquée dans tous types de soirées danse et initiations : Swing, Rock, Forró, Danses Traditionnelles, Tango, …

Merci à Cécile pour cette amitié née au cours de nos discussions dans le bureau, renforcée à la salle de sport et scellée au cours de nos nombreuses soirées Salsa, Batchata, Kizomba, … 😊 Merci pour ton soutien en toutes circonstances.

Merci également à Manon, collègue, mais avant tout amie avec qui j'ai passé beaucoup de super moments. Merci pour toutes les soirées jeux qu'on a pu faire et tous ces dimanches organisés avec Julien, Sami, Ilona et Mattéo. Merci à vous 5 pour votre soutien et tous ces moments passés. Merci Ilona, alias « Tic » … ou « Tac » ? (on ne sait plus 😊), pour cette amitié si rapide et notre duo si peu discret à la salle de sport ! J'espère que l'on restera ce duo complice même si Sami et Mattéo essaient encore de nous piquer notre surnom 😊

Je tiens à remercier mes amis, Emmeline, Guillaume, Julien L., Laura, Laurent, Lucie, Robin, Sami M. et Stéphane, qui ont toujours été présents, bien qu'ils soient éloignés. Merci à Robin avec qui notre amitié

s’est renforcée au cours de cette thèse. Merci pour ton aide lors de mon départ en Allemagne, pour ton soutien immense et toutes nos discussions. Je remercie particulièrement mon trio de folie, Lucie, Laura et Emmeline, avec qui nous avons établi cette règle de « week-end entre filles ». Merci pour ces week-ends organisés tous plus fous les uns que les autres et pour tous ceux à venir qui j’en suis sûre seront tout aussi bien avec toujours plus de rires ! Merci à Julien pour la découverte de ce fameux jeu de société qui est devenu LE JEU incontournable de nos week-ends et dont on ne peut plus se passer ☺ Bon courage à toi, ma Lucie, pour la dernière ligne droite de ta thèse. Merci à Laura O. pour son amitié et son soutien, même s’il est difficile de se voir, bien que nous soyons dans la même ville. Félicitations à toi pour ton titre de Docteur en Médecine !

Enfin, je tiens à remercier mes parents, ma sœur, Antoine, ma grand-mère et le reste de ma famille toujours là pour me soutenir et m’encourager.

Une expérience se termine, une page se tourne mais le chemin reste long et sera probablement rempli de nouvelles expériences, de nouvelles rencontres et d’émotions à partager.

Serment des docteurs

“En présence de mes pairs.

Parvenue à l’issue de mon doctorat en Infectiologie, Physiopathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition, et ayant ainsi pratiqué, dans ma quête du savoir, l’exercice d’une recherche scientifique exigeante, en cultivant la rigueur intellectuelle, la réflexivité éthique et dans le respect des principes de l’intégrité scientifique, je m’engage, pour ce qui dépendra de moi, dans la suite de ma carrière professionnelle quel qu’en soit le secteur ou le domaine d’activité, à maintenir une conduite intègre dans mon rapport au savoir, mes méthodes et mes résultats.”

Publications et communications issues de la thèse

Publications acceptées issues de la thèse

Mussard E., Lencina C., Gallo L., Barilly C., Poli M, Feve K., Albin M., Cauquil L., Knudsen C., Achard C., Devailly G., Soler L., Combes S. and Beaumont M. (**2022**). The phenotype of the gut region is more stably retained than developmental stage in piglet intestinal organoids. Frontiers in Cell and Developmental Biology 10:983031. doi: 10.3389/fcell.2022.983031

Mussard E., Lencina C., Boudry G., Achard C.S., Klotz C., Combes S. and Beaumont M. (**2023**). Culture of piglet intestinal 3D organoids from cryopreserved epithelial crypts and establishment of cell monolayers. Journal of Visualized Experiments. (192), e64917, doi:10.3791/64917

Publication en préparation

Mussard E., Achard C., Lencina C., Cauquil L., Combes S. and Beaumont M. (**en préparation**). Effets de produits dérivés de micro-organismes sur des monocouches de cellules d'organoïdes de jéjunum de porcelets.

Communications affichées et orales

Mussard E, Lencina C, Gallo L, Albin M, Cauquil L, Knudsen C, Achard C, Pinton P, Soler-Vasco L, Combes S, Beaumont M. Development of an intestinal organoid model to study host-microbiota interactions in piglets. 12th Symposium on Gut Microbiology, 2021, Virtual Seminar, poster.

Mussard E, Lencina C, Gallo L, Albin M, Cauquil L, Knudsen C, Achard C, Pinton P, Soler-Vasco L, Combes S, Beaumont M. Creation and phenotyping of a biobank of piglet intestinal organoids. Groupe d'étude INRAE sur les organoïdes chez les animaux d'élevage, 2021, Séminaire virtuel, communication orale.

Mussard E, Lencina C, Gallo L, Albin M, Cauquil L, Knudsen C, Achard C, Pinton P, Soler-Vasco L, Combes S, Beaumont M. Characterization of an organoid model to study the intestinal epithelium in piglets. Digestive Physiology of Pig, 2022, Rotterdam, Netherland, oral communication.

Autres publications

Beaumont M, **Mussard E**, Barilly C, Lencina C, Gress L, Painteaux L, Gabinaud B, Cauquil L, Aymard P, Canlet C, Paës C, Knudsen C and Combes S (**2021**). Developmental Stage, Solid Food Introduction, and Suckling Cessation Differentially Influence the Comaturation of the Gut Microbiota and Intestinal Epithelium in Rabbits. The Journal of Nutrition, nxab411. doi: 10.1093/jn/nxab411

Beaumont M, Paës C, **Mussard E**, Knudsen C, Cauquil L, Aymard P, Barilly C, Gabinaud B, Zemb O, Fourre S, Gautier R, Lencina C, Eutamène H, Theodorou V, Canlet C and Combes S (**2020**). Gut microbiota derived metabolites contribute to intestinal barrier maturation at the suckling-to-weaning transition. Gut Microbes, 11:5, 1268-1286, DOI: 10.1080/19490976.2020.1747335

Mussard E, Pouzet C, Helies V, Pascal G, Fourre S, Cherbuy C, et Rubio A, Vergnolle N, Combes S and Beaumont M (**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. doi: 10.1016/j.scr.2020.101980

Contexte de réalisation de la thèse

La thèse présentée dans ce manuscrit a été réalisée dans l'**équipe « Nutrition et Ecosystèmes Digestifs » (NED)** de l'Unité Mixte de Recherche « Génétique Physiologie et Systèmes d'Elevage » (UMR GenPhySE 1388) dirigée par Juliette Riquet dans le centre INRAE Occitanie-Toulouse. L'équipe NED étudie le microbiote intestinal des animaux d'élevage dans le contexte de la transition des systèmes d'élevage pour améliorer leur durabilité. Le premier objectif de l'équipe est d'optimiser l'utilisation des ressources alimentaires par les animaux en améliorant l'action du microbiote intestinal sur la digestion et le métabolisme de l'hôte. Le deuxième objectif de l'équipe est de renforcer la santé digestive des animaux par une modulation du microbiote pour réduire l'utilisation des antibiotiques afin de limiter la propagation de l'antibiorésistance.

Cette thèse s'est inscrite dans le cadre du **projet OrganoPig** (2020-2022) financé par l'Institut Carnot France Futur Elevage et coordonné par Martin Beaumont (UMR GenPhySE). Ce projet a été mené en partenariat avec une équipe de l'UMR TOXALIM (INRAE, Toulouse) experte pour l'étude de la physiologie digestive du porc. L'entreprise Lallemand Nutrition Animale, spécialisée dans le développement, la production et la commercialisation de produits nutritionnels à base de bactéries ou de levures probiotiques, était également partenaire du projet. L'objectif du projet OrganoPig était de développer un système de culture *in vitro* d'**organoïdes intestinaux de porcelet**. La thèse a été encadrée au sein de l'équipe NED par Martin Beaumont (co-directeur de thèse) et Sylvie Combes (co-directrice de thèse).

La thèse a bénéficié du **dispositif CIFRE** (Convention industrielle de formation par la recherche) de l'ANRT (Association Nationale de la Recherche Technologique) avec pour partenaire industriel, l'unité d'affaire Nutrition Animale de l'entreprise Lallemand. Caroline Achard et Emmanuelle Apper étaient les deux responsables scientifiques au sein de l'entreprise.

La participation au parcours « Ecole internationale de recherche d'Agreenium » (**EIR-A)** a permis la réalisation au cours de la thèse d'un séjour de 3 mois dans l'équipe « Agents mycotiques, parasitaires et mycobactéries » de l'institut Robert Koch à Berlin (Allemagne). Ce séjour encadré par Christian Klotz avait pour objectif de développer un protocole fonctionnel pour l'établissement de la culture en monocouche de cellules épithéliales dérivées d'organoïdes intestinaux de porc.

Table des matières

Remerciements **5**

Serment des docteurs **9**

Publications et communications issues de la thèse **11**

Contexte de réalisation de la thèse **13**

Table des matières **14**

Liste des figures **17**

Liste des tableaux **19**

Liste des abréviations **20**

Introduction générale ***23***

Etude bibliographique ***27***

Chapitre 1 : Organisation et fonctions de l'intestin et de son épithélium **29**

I. Structure de l'intestin et de sa muqueuse 29

I.A. Organisation et fonctions des segments de l'intestin 29

I.B. Organisation de la muqueuse intestinale 30

II. Organisation et renouvellement de l'épithélium intestinal 32

II.A. Organisation de l'épithélium intestinal 32

II.B. Les cellules souches et leur rôle dans le renouvellement des cellules épithéliales intestinales 32

II.C. Les cellules différenciées de l'épithélium intestinal 34

II.C.1. Les cellules de la lignée absorbante 34

II.C.2. Les cellules de la lignée sécrétoire 35

III. Voies de signalisation impliquées dans le renouvellement et la différenciation de l'épithélium 39

III.A. La voie de signalisation Wnt/β-caténine 39

III.B. La voie de signalisation Notch 41

III.C. La voie de signalisation des BMP 42

III.D. La voie de signalisation EGF 43

III.E. Régionalisation de l'épithélium intestinal 43

IV. Fonctions de l'épithélium intestinal 44

IV.A. Sécrétion et absorption d'eau et d'électrolytes 44

IV.B. Digestion, absorption et détection des nutriments 45

IV.C. Fonction de barrière de l'épithélium intestinal 46

IV.C.1. Jonctions cellulaires de l'épithélium intestinal 47

IV.C.2. Production et rôle du mucus intestinal 48

IV.C.3. Sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales intestinales 50

IV.C.4. Détection de micro-organismes par l'épithélium intestinal 51

IV.C.5. Equilibre protéolytique de l'épithélium intestinal 52

IV.C.6. Equilibre d'oxydoréduction dans l'épithélium intestinal 53

V. Colonisation de l'intestin par le microbiote et conséquences pour l'épithélium 54

Chapitre 2 : Le sevrage, une période critique pour la santé digestive chez le porcelet **57**

I. Le sevrage des porcelets 57

I.A. Sevrage en condition naturelle et en élevage conventionnel 57

I.B. Troubles digestifs post-sevrage chez le porcelet 58

II. Adaptations intestinales lors du sevrage chez le porcelet 59

II.A. Modification de la morphologie de l'épithélium intestinal lors du sevrage des porcelets 59
II.B. Adaptation de la fonction de nutrition de l'épithélium lors du sevrage des porcelets 60
II.C. Adaptation de la fonction barrière de l'épithélium intestinal lors du sevrage des porcelets 63
II.D. Réponses immunitaires intestinales et stress oxydant lors du sevrage des porcelets 66
II.E. Adaptation du microbiote intestinal lors du sevrage des porcelets 67
III. Alternatives aux antibiotiques pour la prévention des diarrhées post-sevrage chez le porcelet 71
III.A. Problématique de l'antibiorésistance dans le contexte de la lutte contre les diarrhées post-sevrage des porcelets 71
III.B. Alternatives non-antibiotique existantes pour lutter contre les troubles digestifs post-sevrage chez les porcelets 72
III.C. Présentation du YANG®, un postbiotique à base de levures 74
III.D. Présentation de la bactérie probiotique *Lactobacillus helveticus* R0052 75

Chapitre 3 : Les organoïdes intestinaux 77
I. Modèles conventionnels d'étude de l'épithélium intestinal 78
I.A. Le modèle d'explant d'intestin *ex vivo* 78
I.B. Les lignées de cellules épithéliales intestinales *in vitro* 78
II. Méthodes utilisées pour cultiver des organoïdes intestinaux 80
II.A. Origine des cellules souches utilisées pour cultiver des organoïdes intestinaux 81
II.B. Reconstitution *in vitro* du microenvironnement des cellules souches épithéliales intestinales 82
II.B.1. Reconstitution *in vitro* de la matrice extracellulaire 82
II.B.2. Reproduction *in vitro* de la niche des cellules souches épithéliales intestinales 83
II.C. Cycle de culture des organoïdes intestinaux 89
III. Phénotype des organoïdes intestinaux 90
III.A. Architecture et composition cellulaire des organoïdes intestinaux cultivés en 3 dimensions 90
III.B. Maintien du phénotype du tissu intestinal d'origine dans les organoïdes, stabilité et variabilité inter-individuelle 91
III.C. Maintien de l'identité du segment digestif dans les organoïdes 93
III.D. Maintien de l'identité du stade de développement dans les organoïdes intestinaux 95
IV. Polarisation des cellules dans les organoïdes intestinaux 99
IV.A. Difficulté d'accès au pôle apical des cellules dans les organoïdes 3D 99
IV.B. Méthodes d'accès au pôle apical des cellules épithéliales d'organoïdes 99

Objectifs 107

Etudes expérimentales 111

Caractéristiques des organoïdes intestinaux dérivées de jéjunum et de côlon de porcelets allaités ou sevrés 113
Article 1 114
Données complémentaires de l'article 1 148

Culture d'organoïdes d'intestin de porcelets à partir de cryptes épithéliales congelées et établissement de monocouches de cellules 151
Article 2 152
Données complémentaires de l'article 2 174

Effets de produits dérivés de micro-organismes sur un modèle de monocouches de cellules d'organoïdes intestinaux de porcelets 179
Article 3 180

Discussion générale et Perspectives 213

Conclusion générale 231

Références bibliographiques 235

***Abstract*.....265**

***Résumé*.....266**

Liste des figures

FIGURE 1 : MORPHOLOGIE DU TRACTUS DIGESTIF CHEZ LE PORC 30
FIGURE 2 : STRUCTURE DE LA MUQUEUSE INTESTINALE 31
FIGURE 3 : RENOUVELLEMENT DE L'EPITHELIUM INTESTINAL 33
FIGURE 4 : TYPES CELLULAIRES PRESENTS DANS L'EPITHELIUM INTESTINAL CHEZ LE PORC 36
FIGURE 5 : PROPORTION DES DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES AU NIVEAU DE L'EPITHELIUM INTESTINAL HUMAIN 37
FIGURE 6 : VOIES DE SIGNALISATION ET FACTEURS DE TRANSCRIPTION IMPLIQUES DANS L'IDENTITE DES CELLULES DE L'EPITHELIUM INTESTINAL 37
FIGURE 7 : PRINCIPALES VOIES DE SIGNALISATION ET SOURCES DES SIGNAUX DANS LES CRYPTES EPITHELIALES 40
FIGURE 8 : MECANISME D'ACTION DES PRINCIPALES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS LE RENOUVELLEMENT ET LA DIFFERENCIATION DE L'EPITHELIUM INTESTINAL 42
FIGURE 9 : REGULATION DE L'IDENTITE DES CELLULES EPITHELIALES EN FONCTION DE LEUR LOCALISATION DANS L'INTESTIN 44
FIGURE 10 : MARQUEURS DES CELLULES ABSORBANTES DE L'INTESTIN GRELE ET DU COLON CHEZ LE PORC 45
FIGURE 11 : VOIES DE PERMEABILITE CELLULAIRE ET COMPLEXES DE JONCTIONS PROTEIQUES ENTRE LES CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES 48
FIGURE 12 : ORGANISATION DU MUCUS DANS L'INTESTIN GRELE ET LE COLON. 49
FIGURE 13 : ROLE DES PEPTIDES ANTIMICROBIENS SECRETES PAR L'EPITHELIUM INTESTINAL 50
FIGURE 14 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES SYSTEMES DE DETECTION DE MOTIFS MOLECULAIRES BACTERIENS PAR LES CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES. 51
FIGURE 15 : COMPOSITION DU MICROBIOTE INTESTINAL DU PORC EN FONCTION DES SEGMENTS INTESTINAUX 55
FIGURE 16 : MECANISMES D'ACTION ET EFFETS DU BUTYRATE SUR L'EPITHELIUM INTESTINAL 56
FIGURE 17 : ACTIVITE ENZYMATIQUES LACTASE, SUCRASE, MALTASE ET DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV DANS LE JEJUNUM DE PORCELETS LORS DU SEVRAGE 61
FIGURE 18 : MODIFICATION DE L'ABSORPTION DU GLUCOSE Na^+ DEPENDANTE DANS LE JEJUNUM DE PORCELETS APRES LE SEVRAGE 62
FIGURE 19 : IMPACT DU SEVRAGE SUR LE TRANSPORT D'IONS DANS L'INTESTIN DES PORCELETS 63
FIGURE 20 : EFFET DU SEVRAGE SUR LA PERMEABILITE PARACELLULAIRE DU JEJUNUM DU PORCELET. 64
FIGURE 21 : EFFET DE L'AGE DU SEVRAGE SUR LA PERMEABILITE PARACELLULAIRE AU NIVEAU DU JEJUNUM DE PORCELET 64
FIGURE 22 : EFFET DU SEVRAGE SUR LA COUCHE DE MUCUS ET LES CELLULES EN GOBELET 65
FIGURE 23 : EFFET DU SEVRAGE SUR L'EXPRESSION DES TOLL-LIKE RECEPTORS (TLR) DANS L'ILEON DE PORCELETS 66
FIGURE 24 : COLONISATION DU MICROBIOTE DE PORCELETS ALLAITES ET ALIMENTES PRECOCEMENT COMPARATIVEMENT A DES PORCELETS EXCLUSIVEMENT ALLAITES. 68
FIGURE 25 : DEVELOPPEMENT POST-NATAL DE L'INTESTIN CHEZ LE PORCELET ET IMPACT DU SEVRAGE PRECOCE 69
FIGURE 26 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MODIFICATIONS DE L'HOMEOSTASIE INTESTINALE OBSERVEE LORS DU SEVRAGE PRECOCE CHEZ LE PORCELET 70
FIGURE 27 : MECANISME DE DISSEMINATION DE L'ANTIBIORESISTANCE 72
FIGURE 28 : MECANISMES D'ACTION DES POSTBIOTIQUES ET EXEMPLE DE MOLECULES EFFECTRICES. 74
FIGURE 29 : PRINCIPES DE BASE POUR L'UTILISATION DES ANIMAUX ET L'ETHIQUE DE LA RECHERCHE 77
FIGURE 30 : REPRESENTATION DES DIFFERENTES SOURCES DE CELLULES POUR L'ELABORATION DE LIGNEE CELLULAIRE 79
FIGURE 31 : CARACTERISATION DES CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES PORCINES IPEC-1 ET IPEC-J2 80
FIGURE 32 : TECHNIQUES D'OBTENTION DES CELLULES SOUCHES POUR LA CULTURE D'ORGANOÏDES INTESTINAUX. 82
FIGURE 33 : MODE D'ACTION DES PRINCIPAUX COMPOSANTS DU MILIEU DE CULTURE DES ORGANOÏDES INTESTINAUX 86
FIGURE 34 : EVOLUTION D'UNE CRYPTE INTESTINALE DE COLON HUMAIN EN CULTURE 89
FIGURE 35 : FORMATION *IN VITRO* D'UN ORGANOÏDE D'INTESTIN A PARTIR D'UNE CELLULE SOUCHE ISOLEE 89
FIGURE 36 : CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DES ORGANOÏDES INTESTINAUX 91
FIGURE 37 : TYPES CELLULAIRES PRESENTS *IN VITRO* DANS LES ORGANOÏDES INTESTINAUX DE PORC 91
FIGURE 38 : PROFIL D'EXPRESSION DES GENES DANS DES ORGANOÏDES DE COLON HUMAIN ET DANS LES TISSUS D'ORIGINE 92
FIGURE 39 : PROFIL D'EXPRESSION DES GENES DANS DES ORGANOÏDES D'INTESTIN GRELE ET DE COLON ET DANS LES CELLULES EPITHELIALES D'ORIGINE ISSUES DE TISSUS ADULTES OU FŒTAUX 94

FIGURE 40 : EXPRESSION RELATIVE DES ARNM DE GENES LIES A L'IMMUNITE DANS DES ORGANOÏDES ISSUS DE PLUSIEURS SEGMENTS DU TRACTUS GASTRO-INTESTINAL MURIN (A GAUCHE) ET HUMAIN (A DROITE) 94
FIGURE 41 : PROFIL D'EXPRESSION DE GENES DANS DES ORGANOÏDES D'INTESTIN GRELE HUMAIN FŒTAUX OU ADULTES..... 96
FIGURE 42 : MATURATION DE L'EPITHELIUM INTESTINAL *IN VITRO* 97
FIGURE 43 : EXPRESSION DU GENE DE LA LACTASE DANS LE JEJUNUM PORCIN ET DANS DES ORGANOÏDES D'INTESTIN GRELE ISSUS DE DIVERS STADES DE DEVELOPPEMENT 98
FIGURE 44 : POLARISATION DES CELLULES EPITHELIALES DANS LES ORGANOÏDES INTESTINAUX 99
FIGURE 45 : METHODE D'ACCES AU POLE APICAL DES CELLULES EPITHELIALES A PARTIR DES ORGANOÏDES 3D..... 101
FIGURE 46 : CARACTERISATION DES MONOCOUCHES DE CELLULES EPITHELIALES DERIVEES D'ORGANOÏDES INTESTINAUX DE PORC .. 102
FIGURE 47 : OBSERVATION EN MICROSCOPIE CONFOCALE D'ORGANOÏDES DE JEJUNUM DE PORCELETS ALLAITES CULTIVES EN 3 DIMENSIONS. 150
FIGURE 48 : OBSERVATION EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION D'ORGANOÏDES DE JEJUNUM DE PORCELETS ALLAITES CULTIVES EN 3 DIMENSIONS. 150
FIGURE 49 : COMPARAISON DE L'EXPRESSION DE GENES DANS DES ORGANOÏDES DE JEJUNUM DE PORCELETS ALLAITES CULTIVES EN 3 DIMENSIONS OU EN MONOCOUCHE. 175
FIGURE 50 : MESURE EN CONTINU DE LA RESISTANCE ELECTRIQUE TRANSEPITHELIALE DE MONOCOUCHES DE CELLULES D'ORGANOÏDES D'ILEON DE PORCELETS. 177
FIGURE 51 : REPRESENTATION SCHEMATIQUES DES DIFFERENTES EXPERIENCES REALISEES AU COURS DE L'ETUDE 3..... 181
FIGURE 52 : ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE DE L'EXPRESSION DE GENES DANS LES CRYPTES ET LES ORGANOÏDES INTESTINAUX DE PORCELETS ALLAITES. 217
FIGURE 53 : ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE DE L'EXPRESSION DE GENES DANS LES MONOCOUCHES DE CELLULES ORGANOÏDES DE JEJUNUM DE PORCELETS..... 226
FIGURE 54 : EXEMPLES DE MODELES DE CULTURE DE CELLULES D'ORGANOÏDES SUR DES MICROSTRUCTURES 229

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : TAILLE DES VILLOSITES ET DES CRYPTES DANS L'INTESTIN GRELE DE PORCELETS APRES LE SEVRAGE (21 JOURS) 60
TABLEAU 2 : PRINCIPAUX REACTIFS, FACTEURS DE CROISSANCE ET DE DIFFERENCIATION UTILISES DANS LES MILIEUX DE CULTURE DES ORGANOÏDES INTESTINAUX 84
TABLEAU 3 : DESCRIPTIONS DES ETUDES UTILISANT DES ORGANOÏDES INTESTINAUX DE PORC 87
TABLEAU 4 : DESCRIPTIONS DES ETUDES UTILISANT DES MONOCOUCHES DE CELLULES DERIVEES D'ORGANOÏDES INTESTINAUX DE PORC 104
TABLEAU 5 : AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES LIGNEES CELLULAIRES ET DES ORGANOÏDES D'INTESTIN DE PORC POUR TESTER DES PRODUITS NUTRITIONNELS 227

Liste des abréviations

2D : 2 dimensions

3D : 3 dimensions

A-B

ALPI : Alcaline phosphatase intestinale

AGCC : Acide gras à courte chaine

APC : *Adenomatous popyposis coli*

AQP : Aquaporine

ARG2 : Arginase 2

ARN : Acide ribonucléique

ASC : Adult stem cell

ASCL2 : Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 2

ATOH1 : Atonal BHLH Transcription Factor 1

BMP : Bone morphogenic protein

C

CA : Carbonic anhydrase

CBC : Crypt base columnar

CCK : Cholécystokinine

CDH1 : E-cadhérine

CDX2 : Caudal Type Homeobox 2

CFTR : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CGN : Cinguline

CHGA : Chromogranine A

D

DAPT : (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl-L-alanyl)]-(S)-phenylglycine t-butyl ester)

DDP4 : Dipeptidyl peptidase-4

DEFB1 : Défensine β-1

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DON : Déoxynivalénol

DTT : 1,4-dithiothreitol

DUOX : Dual oxydase

E-F

E. coli : *Escherichia coli*

EDTA : Ethylène diamine tétra acétique

EGF : Epidermal growth factor

ESC : Embryonic Stem Cells

ETEC : *E. coli* entérotoxigénique

EPEC : *E. coli* entéropathogénique

FABP : Fatty acid binding protein

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

G

GCG : Glucagon

GLUT : Glucose transporter

GPX : Glutathione peroxidase

GSK-3 : Glycogène synthase kinase 3

H-I

H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène

HDAC : Histone désacétylase

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HES : Hairy enhancer of split

HRP : Horseradish peroxidase

iPSC : Induced pluripotent stem cell

L

LCT : Lactase

LGR : Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled *receptor*

LPS : Lipopolysaccharide

L-WRN : Lignée cellulaire L modifiée pour la sécrétion des facteurs de souche Wnt3a, R-spondine et Noggin

LYZ : Lysozyme

M-N-O

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MEC : Matrice extracellulaire

MET : Microscopie électronique à transmission

MKI67 : Ki-67 antigen

MUC : Mucine

NAC : N-acetyl cystéine

NEUROG3 : Neurogenin 3

NICD : Notch intracellular model

NOD : Nucléotide-binding oligomerization domain

NOX : NADPH oxydase

OGM : Organoids growth medium

OLFM4 : Olfactomedin 4

P

PAR : Protease-activated receptor

PBS : Phosphate buffered saline

PCNA : Proliferative cell nuclear antigen

PDCoV : Delta coronavirus porcin

PEDV : Virus de la diarrhée épidémique porcine

PEG : Poly(éthylène glycol)

PEPT1 : Peptide transporter 1

PGE2 : Prostaglandine 2

PI3 : Peptidase inhibitor 3

PRR : Pattern recognition receptors

P/S : Pénicilline / Streptomycine

PTGS2 : Prostaglandin-endoperoxide synthase 2

PIPM : Porcine intestinal proliferation medium

PIDM : Porcine intestinal differenciation medium

PYY : Peptide YY

R

REG3G : Regenerating islet-derived protein 3 γ

REG4 : Regenerating Family member 4

rh : Recombinant human

rm : Recombinant mouse

RNA-seq : Séquençage de l'ARN

ROCK : Rho-associated kinase

ROS : Reactive oxygen species

S

SGLT1 : sodium-dependent glucose transporter 1

SI : Sucrase isomaltase

Single cell RNA-seq : Séquençage de l'ARN en cellule unique

SLPI : Secretory leukocyte peptidase inhibitor

SMOC2 : SPARC Related Modular Calcium Binding 2

SOX : SRY-Box Transcription Factor

SPDEF : SAM Pointed Domain Containing ETS Transcription Factor

SVF (FBS) : Sérum de veau fœtal

T-Z

TA : Transit-amplifying

TFF3 : Trefoil factor 3

TEER : Transepithelial electrical resistance

TGF : Transforming growth factor

TJP : Tight junction protein

TNF : Tumor necrosis factor

TNFSF : Superfamille des TNF

UEA-1 : Ulex Europaeus Agglutinin I

VIL1 : Villine 1

ZO : Zonula occludens

Introduction générale

Chez le porcelet, le **sevrage** est une période critique pour la santé digestive. En effet, lors du sevrage, l'arrêt de l'alimentation lactée et l'introduction de l'alimentation solide s'accompagnent de nombreux stress sociaux et environnementaux (*Moeser et al., 2007a*). De plus, en élevage conventionnel le sevrage a lieu autour de 3 à 4 semaines, âge auquel l'intestin est encore en développement (*Moeser et al., 2017*) ce qui conduit à de nombreuses perturbations des fonctions de l'épithélium intestinal. Ces perturbations favorisent l'apparition de **diarrhées dans les premières semaines qui suivent le sevrage** (*Moeser and Blikslager, 2007; Wijtten et al., 2011*).

Le recours à l'antibiothérapie est une pratique courante pour lutter contre ces diarrhées post-sevrage des porcelets. Cette utilisation est largement contestée pour des raisons de santé publique. En effet, l'utilisation massive d'antibiotiques crée une pression sélective des micro-organismes résistants aux antibiotiques (*Barton, 2014*). Face au développement de l'**antibiorésistance**, des plans de réduction de l'utilisation des antibiotiques en élevage ont été mis en place (*Paul et al., 2022*). Il est donc important de trouver des alternatives non-antibiotiques pour préserver la santé digestive des porcelets autour du sevrage. Parmi les nombreuses stratégies proposées, une des approches les plus prometteuses consiste à utiliser des **probiotiques** (micro-organismes vivants apportant un bénéfice à la santé) (*Heo et al., 2013*). Cependant, les probiotiques présentent certaines limites liées à leur conservation ou au risque de translocation vers la circulation sanguine en cas de barrière intestinale affaiblie (*Salminen et al., 2021*). Plus récemment, le concept de **postbiotiques** a été proposé pour contourner les limites des probiotiques. Il s'agit de « préparations de micro-organismes probiotiques inactivés et/ou de leur composant qui confèrent un avantage pour la santé de l'hôte" (*Salminen et al., 2021*).

Le développement de nouveaux postbiotiques nécessite des modèles adaptés pour étudier leurs effets sur l'épithélium intestinal du porcelet. Bien que les expérimentations *in vivo* soient les plus adaptées, leur utilisation est couteuse et permet difficilement l'étude des mécanismes mis en jeu. De plus, pour des raisons éthiques, l'expérimentation animale est largement réglementée selon la règle des **3R** (Remplacement, Réduction, Raffinement) (*Costa and Ahluwalia, 2019*). Des **modèles *ex vivo/in vitro*** (explants ou lignées cellulaires) permettent l'étude de l'épithélium intestinal du porc. Cependant, ces modèles présentent de nombreuses limites liées *ex vivo* à une viabilité limitée et *in vitro* à la présence d'anomalies génétiques, au manque de diversité cellulaire comparativement à celle présente dans l'épithélium intestinal, à l'absence de variabilité interindividuelle ainsi qu'au manque de spécificité du segment digestif et du stade de développement d'intérêt (*Marks et al., 2022*).

Les progrès récents dans la biologie des **cellules souches** et leur identification au niveau de l'épithélium intestinal a permis le développement de la culture des **organoïdes intestinaux** (*Barker et al., 2007; Sato et al., 2009*). Il s'agit de structures en trois dimensions (3D) représentant la micro-architecture de l'épithélium intestinal. Ces organoïdes sont directement dérivés des cellules souches de l'espèce d'intérêt et ne présentent pas d'anomalie génétique. Les organoïdes s'auto-renouvellent grâce à la présence de cellules souches. Ces dernières donnent naissance à tous les types cellulaires de l'épithélium intestinal (*Sato et al., 2009*). Enfin, les organoïdes conservent certaines des caractéristiques de leur tissu d'origine, notamment liés à la localisation dans l'intestin (*Middendorp et al., 2014*). Des organoïdes intestinaux ont été développés chez le porc mais leur caractérisation reste très incomplète (*Gonzalez et al., 2013; Beaumont et al., 2021a*). En effet, les études utilisant des organoïdes intestinaux de porc ont généralement peu pris en compte la **variabilité interindividuelle** et leur capacité à maintenir les **caractéristiques des tissus d'origine** est peu connue. Par ailleurs, les conditions classiques de culture en 3D ne sont pas optimales pour tester les effets de postbiotiques sur la barrière épithéliale du porcelet, notamment en raison de la **difficulté d'accès au pôle apical** des cellules.

Dans ce contexte, l'objectif général de cette thèse était de développer et caractériser un modèle de culture d'organoïdes d'intestin de porcelets permettant de tester les effets de postbiotiques ciblant la fonction de barrière de l'épithélium intestinal.

Ce manuscrit présente tout d'abord une étude bibliographique permettant de décrire les connaissances actuelles concernant (i) la physiologie de l'intestin et plus particulièrement de l'épithélium intestinal ; (ii) le sevrage des porcelets et ses conséquences pour la santé digestive et l'épithélium intestinal. Cette partie présente également l'intérêt des postbiotiques pour renforcer la santé digestive lors du sevrage dans le contexte de la réduction de l'utilisation des antibiotiques en élevage ; et (iii) les différents modèles d'étude de l'épithélium intestinal *in vitro* et plus particulièrement les organoïdes intestinaux. Dans une seconde partie, après avoir présenté les différents objectifs de la thèse et les stratégies expérimentales, les résultats seront présentés sous la forme de trois articles scientifiques. Enfin, une troisième partie permettra de discuter les résultats en relation avec la bibliographie afin de répondre à l'objectif initial et émettre des perspectives à ce travail de thèse.

Etude bibliographique

Chapitre 1 : Organisation et fonctions de l'intestin et de son épithélium

Dans ce chapitre, l'organisation générale de l'intestin sera brièvement présentée avant de détailler la structure et le fonctionnement de l'épithélium. Les mécanismes impliqués dans le renouvellement et la différenciation de l'épithélium seront particulièrement développés en raison de l'importance de leur compréhension pour le développement de la culture des organoïdes intestinaux. Ensuite, les fonctions de l'épithélium intestinal pour la nutrition et la défense de l'organisme seront présentées. Le rôle des gènes dont l'expression a été étudiée dans ce travail de thèse ont été décrits en priorité. De plus, les spécificités de l'épithélium intestinal en fonction de la position longitudinale dans l'intestin ont été décrites. Enfin, les informations présentées ici sont principalement issues de travaux menés chez l'homme ou chez les espèces modèles de rongeurs mais les études concernant le porc sont citées quand elles existent.

I. Structure de l'intestin et de sa muqueuse

I.A. Organisation et fonctions des segments de l'intestin

L'intestin fait partie du système digestif et forme un tube par lequel transitent les aliments. L'intestin constitue une interface entre l'environnement et l'intérieur de l'organisme. Cette position est associée à de multiples fonctions telles que le transport et la digestion des aliments, l'absorption d'eau, d'électrolytes et de nutriments tout en assurant la protection contre l'environnement luminal et l'élimination des déchets (*Rowan et al., 1997; Helander and Fändriks, 2014*). Situé en aval de l'estomac, l'intestin est composé de différents segments formant deux grandes régions : l'intestin grêle et le gros intestin (***Figure 1***).

L'**intestin grêle** est sous-divisé en trois segments le long de l'axe céphalo-caudal avec successivement le duodénum, le jéjunum et l'iléon (***Figure 1***). Le **duodénum** est le segment le plus court de l'intestin grêle. Il reçoit la chyme alimentaire (aliments partiellement digérés) ainsi que les sécrétions biliaires et pancréatiques permettant de compléter la digestion chimique des aliments initiée dans l'estomac (*Rowan et al., 1997*). Le duodénum produit également des enzyme digestives et participe à l'absorption d'ions, du calcium et de vitamines (*Middendorp et al., 2014; Thompson et al., 2018*). Le **jéjunum** poursuit la digestion et constitue le principal site d'absorption des nutriments (lipides, protéines, glucides) (*Rowan et al., 1997; Lema et al., 2020*). Enfin, l'**iléon** absorbe les composés résiduels non absorbés par le jéjunum tel que des vitamines et acides biliaires conjugués. Le **gros intestin** est composé du cæcum et du côlon (***Figure 1***) (*Rowan et al., 1997; Thompson et al., 2018*). Ce segment est spécialisé dans l'absorption d'eau et d'électrolytes et héberge la densité microbienne la plus importante de l'intestin (*Rowan et al., 1997*). Le microbiote du gros intestin contribue à la digestion en dégradant les fibres et les glucides complexes, non digérés par les enzymes de l'hôte, principalement en acides gras à courtes chaines (AGCC) absorbés par les cellules épithéliales du côlon (*détaillé dans la partie V*).

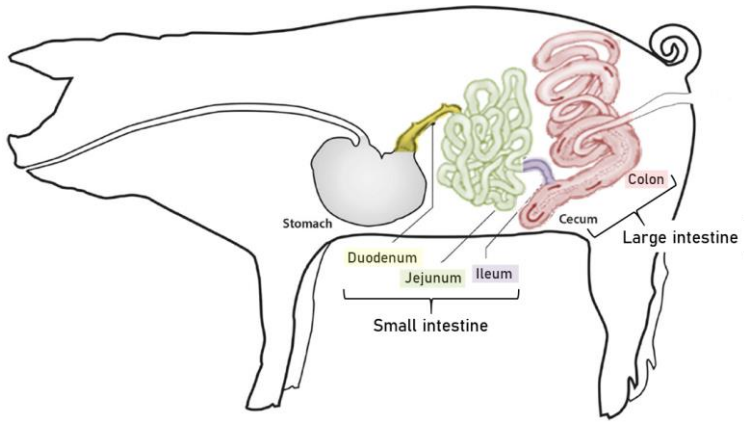


FIGURE 1 : MORPHOLOGIE DU TRACTUS DIGESTIF CHEZ LE PORC
Adapté de Holman et al. (2017).

Pour accomplir ces diverses fonctions, chaque segment de l'intestin possède des caractéristiques architecturales et cellulaires spécialisées, détaillées ci-dessous (*Dutton et al., 2019*). Globalement, l'organisation du tractus digestif du porc est similaire à celle de l'homme. A ce titre, le porc est considéré comme un excellent modèle animal pour la recherche en physio-pathologie digestive (*Ziegler et al., 2016*). Il existe néanmoins quelques spécificités de l'intestin du porc, telles que le développement important du cæcum et l'organisation en spirale du côlon (*Ziegler et al., 2016*).

I.B. Organisation de la muqueuse intestinale

L'intestin est composé de plusieurs couches fonctionnelles se succédant de l'extérieur vers l'intérieur : la séreuse, la musculeuse externe, la sous-muqueuse et la muqueuse (*Dutton et al., 2019*). La **muqueuse intestinale** est la partie la plus superficielle formant une barrière entre la lumière intestinale et l'intérieur de l'organisme. La muqueuse est constituée de **trois sous-couches distinctes** : la muqueuse musculaire, la *lamina propria* et l'épithélium (***Figure 2***) (*Dutton et al., 2019; Pompili et al., 2021*).

La **muqueuse musculaire** (ou *muscularis mucosae*) est constituée d'une fine couche de muscles lisses permettant des contractions localisées. La ***lamina propria*** (ou chorion, ou mésenchyme) est un tissu conjonctif permettant le maintien structurel de l'épithélium intestinal (*Pompili et al., 2021*), accueillant de multiples types cellulaire tels que des cellules immunitaires, des cellules nerveuses, des fibroblastes, ainsi que des vaisseaux sanguins et lymphatiques (*Meran et al., 2017; Dutton et al., 2019; Gehart and Clevers, 2019*). La *lamina propria* fournit également aux cellules épithéliales des signaux impliqués dans l'activation de voies moléculaires participant ainsi à la constitution de la niche des cellules souches (*détaillé dans la partie III*).

Enfin, **l'épithélium** tapissant la surface de l'intestin est formé d'une **monocouche de cellules** situées à l'interface entre l'environnement luminal et le reste de la muqueuse (*Dutton et al., 2019; Pompili et al., 2021*). Les cellules épithéliales reposent sur une **matrice extracellulaire (MEC)** (ou lame basale) (***Figure 2***) constituée d'un réseau complexe et organisé de protéines (*Pompili et al., 2021*). La MEC, située entre les cellules épithéliales et la *lamina propria*, comprend deux couches distinctes étroitement liées : la membrane basale et la matrice interstitielle. La **membrane basale** est

essentiellement composée de protéines structurelles dont les plus abondantes sont le collagène de type IV, les laminines et les protéoglycanes. Ces protéines permettent de constituer des structures complexes permettant la stabilité de la MEC (*Pompili et al., 2021*). La **matrice interstitielle** est située sous la membrane basale et forme une couche structurelle de la *lamina propria* principalement composée de collagène de type I et III. Les divers composants de la MEC sont produits par les cellules épithéliales et par les cellules mésenchymateuses (*Pompili et al., 2021*). La MEC confère à l'intestin son élasticité et sa résistance tout en apportant un soutien mécanique aux cellules épithéliales intestinales (*Pompili et al., 2021*). Elle permet de maintenir l'intégrité structurelle et fonctionnelle de l'épithélium intestinal et constitue également une barrière physique. Les cellules épithéliales intestinales sont ancrées à la membrane basale de la MEC via des protéines transmembranaires appelés intégrines (*Pompili et al., 2021*). Les intégrines influencent également la prolifération, la différenciation, la migration et l'organisation des cellules épithéliales (*Pompili et al., 2021*).

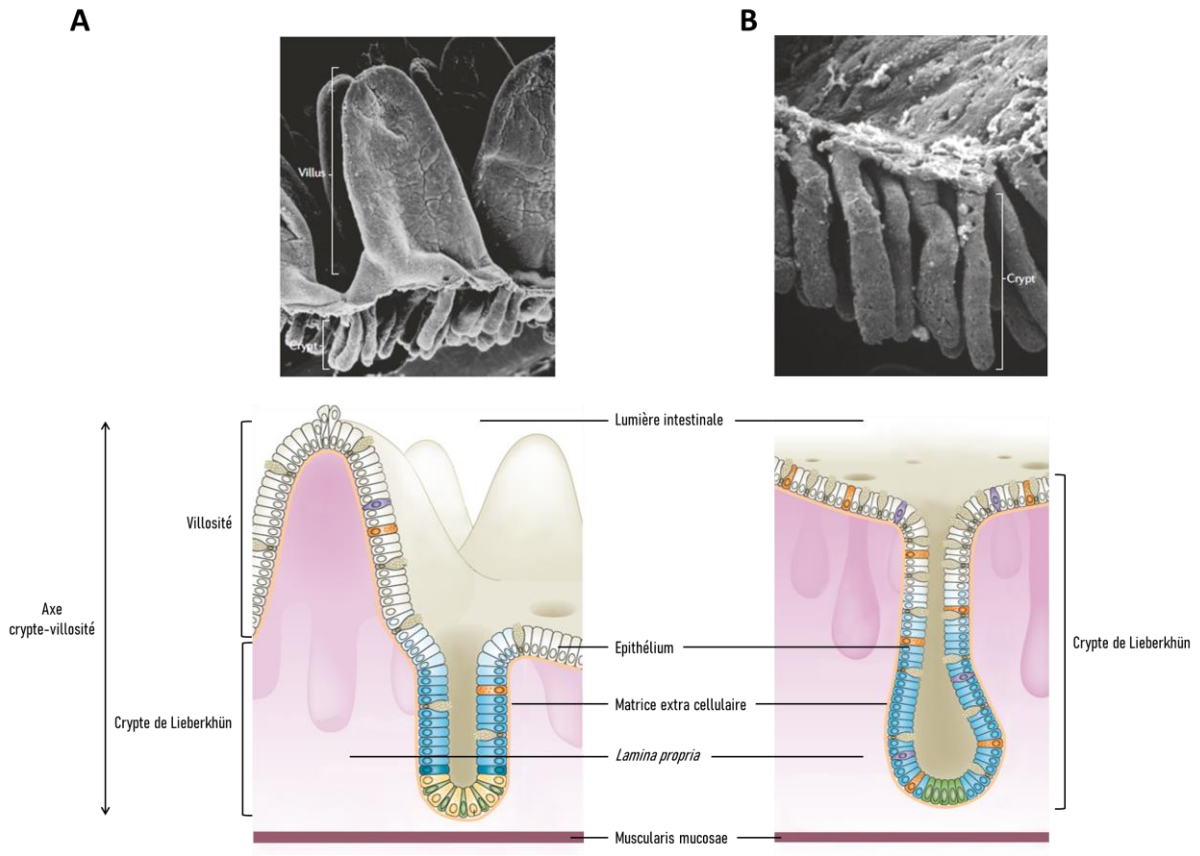


FIGURE 2 : STRUCTURE DE LA MUQUEUSE INTESTINALE

Observation en microscopie électronique à balayage et représentation schématique de la muqueuse dans l'intestin grêle **(A)** et dans le côlon **(B).** La muqueuse intestinale est composée de trois couches de tissus. La couche la plus externe est formée par l'épithélium, constitué d'une monocouche de cellules reposant sur une matrice extracellulaire. La *lamina propria* permet de soutenir la structure de l'épithélium intestinal. La couche la plus interne de la muqueuse intestinale est formée par la *muscularis mucosae*. Des structures de cryptes et de villosités sont observées dans l'intestin grêle alors que seules des cryptes sont présentes au niveau du côlon. Adapté de Barker (2014).

II. Organisation et renouvellement de l'épithélium intestinal

II.A. Organisation de l'épithélium intestinal

Dans l'intestin grêle, l'épithélium est formé par une succession de **structures cryptes-villosités** (***Figure 2***) (*Clevers, 2013; Merker et al., 2016; Gehart and Clevers, 2019*). Les **villosités** correspondent à des protubérances de la muqueuse intestinale orientées en direction de la lumière intestinale. Ces structures permettent de maximiser la surface d'échange avec l'environnement luminal (*Clevers, 2013*). Des capillaires et des vaisseaux lymphatiques sont retrouvés sous chaque villosité ce qui permet d'assurer le transport des nutriments absorbés (*Clevers, 2013*). Chaque villosité est entourée à sa base par de multiples invaginations de l'épithélium intestinal appelées **cryptes de Lieberkühn** formant ainsi des unités villosité/cryptes (*Clevers, 2013; Gehart and Clevers, 2019*). Les villosités les plus grandes sont retrouvées dans le duodénum et leur hauteur diminue le long de l'axe céphalo-caudal (du duodénum à l'iléon), sans modification de la densité, jusqu'à disparaitre complétement au niveau du gros intestin (***Figure 2***) (*Randall et al., 2011; Gehart and Clevers, 2019*).

L'épithélium intestinal est en contact permanent avec l'environnement luminal dont les constituants (antigènes alimentaires, microbiote, pathogènes, métabolites, toxines, etc.) peuvent entrainer des dommages cellulaires (*Merker et al., 2016*). Par conséquent, l'épithélium intestinal est entièrement **renouvelé en 3 à 5 jours** grâce à la présence de cellules souches situées à la base des cryptes (zone prolifération). Au cours de leur différenciation, les cellules migrent du bas de la crypte vers le sommet des villosités dans l'intestin grêle et vers le sommet des cryptes dans le gros intestin (***Figure 3***) (*van der Flier and Clevers, 2009; Barker, 2014; Date and Sato, 2015; Merker et al., 2016*). Le renouvellement constant des cellules épithéliales intestinales à la base des cryptes est contrebalancé par de l'apoptose spontanée de cellules situées au sommet des villosités, ce qui entraine leur expulsion dans la lumière intestinale (*Barker et al., 2007; Sato et al., 2009; van der Flier and Clevers, 2009*). Ce processus appelé **« anoïkis »** est déclenché lors de la perte d'ancrage des cellules à la MEC ou aux cellules voisines (*Hofmann et al., 2007*). Il s'agit d'un processus physiologique de renouvellement de l'épithélium ne compromettant pas le contrôle de la perméabilité. Cet équilibre entre prolifération et mort cellulaire permet de maintenir l'intégrité de l'épithélium intestinal.

II.B. Les cellules souches et leur rôle dans le renouvellement des cellules épithéliales intestinales

Cheng and Leblond (1974) ont proposé pour la première fois le **modèle de cellules CBC (« crypt base columnar » cells**) dans lequel des cellules en forme de colonnes situées à la base des cryptes sont des cellules souches. Des données plus récentes ont confirmé le caractère souche des cellules CBC et ont permis l'identification de marqueurs spécifiques présentés ci-dessous (*Gehart and Clevers, 2019*). La voie Wnt est la principale voie de signalisation impliquée dans le renouvellement de l'épithélium intestinal (*détaillé ci-dessous dans la partie III.B*). C'est pour cette raison que Barker et al. (2007) ont supposé que certains gènes cibles de cette voie pourrait être spécifiquement exprimés au niveau des cellules souches intestinales. En effet, les auteurs ont montré que le gène ***LGR5*** (« Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5 »), codant un récepteur de la voie Wnt, était spécifiquement

exprimé dans les cellules souches (*Barker et al., 2007; Gehart and Clevers, 2019*). D'autres **gènes marqueurs des cellules souches** ont pu être identifiés ultérieurement chez la souris et l'homme avec notamment : (i) ***OLFM4*** («Olfactomedin 4 »), codant pour une glycoprotéine sécrétée cible de la voie Notch (*détaillé ci-dessous dans la partie III.B*) (*Flier et al., 2009; Muñoz et al., 2012*) ; (ii) ***SMOC2*** (« SPARC Related Modular Calcium Binding 2 ») codant une protéine inhibitrice des BMP (« Bone Morphogenic Protein ») (*Muñoz et al., 2012*) ; (iii) ***SOX9*** (« SRY-Box Transcription Factor 9 ») codant pour un facteur de transcription impliqué dans la prolifération cellulaire (*Bastide et al., 2007; Muñoz et al., 2012*), (iv) ***ASCL2*** (« Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 2 ») codant pour un facteur de transcription ciblé par la voie Wnt (*van der Flier et al., 2009; Muñoz et al., 2012*).

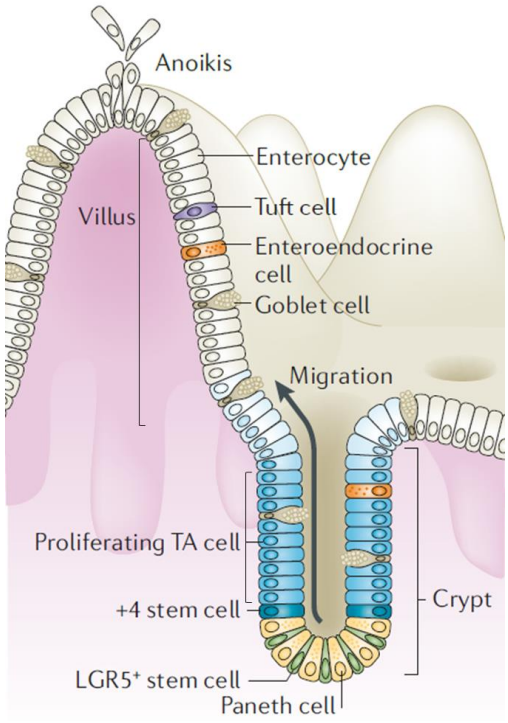


FIGURE 3 : RENOUVELLEMENT DE L'EPITHELIUM INTESTINAL

Les cellules souches situées à la base des cryptes (LGR5⁺) renouvellent en permanence la monocouche de cellules épithéliales. Les cellules filles quittent la niche des cellules souches en migrant vers le sommet des villosités intestinales. Après une phase de prolifération (TA : « transit ampifying »), les cellules épithéliales se différencient en cellules absorbantes (entérocytes en majorité) ou sécrétrices (cellules en gobelet, cellules entéroendocrines, cellules Tuft et cellules de Paneth). Les cellules de Paneth constituent une exception, puisqu'une fois différenciées elles sont dirigées à la base des cryptes. Au sommet des villosités (ou des cryptes dans le gros intestin), les cellules épithéliales sont expulsées par détachement de la lame basale, sans que la perméabilité ne se trouve altérée. L'ensemble de ce processus a lieu en quelques jours. Adapté de Barker (2014).

Les **cellules souches intestinales** se renouvellent en permanence et sont **indifférenciées et multipotentes**, c'est-à-dire capables de donner naissance à tous les types cellulaires de l'épithélium intestinal (*Barker, 2014; Date and Sato, 2015; Merker et al., 2016*). Le nombre estimé de cellules souches est de 4 à 6 par crypte (*Sato et al., 2009*). La division constante des cellules souches permet le renouvellement rapide de l'épithélium intestinal. Les cellules souches suivraient un modèle de division symétrique selon lequel i) les cellules qui se maintiennent dans le fond de la crypte resteraient souches par l'influence du microenvironnement (niche des cellules souches) tandis que ii) les cellules migrant

vers le haut de la crypte s'engageraient dans un processus de différenciation progressif le long de l'axe crypte/villosité (*Lopez-Garcia et al., 2010; Snippert et al., 2010*). Le taux de perte de cellules souches semblerait équivalent au taux de division cellulaire permettant un maintien de l'intégrité épithéliale (*Lopez-Garcia et al., 2010*). Le maintien et la prolifération des cellules souches est coordonné par plusieurs voies de signalisation moléculaires (*détaillé ci-dessous dans la partie III*) également impliquées dans la détermination de l'identité des cellules épithéliales de la base des cryptes vers le sommet des villosités de l'intestin (*Gehart and Clevers, 2019*).

Les cellules quittant la crypte deviennent des **cellules progénitrices** qui prolifèrent rapidement et sont appelées **cellules amplificatrices transitoires** (cellules TA : « transit-amplifying ») (***Figure 3***) (*Sato et al., 2009; van der Flier and Clevers, 2009; Date and Sato, 2015*). Les gènes ***PCNA*** (« Proliferating cell nuclear antigen ») et ***MKI67*** (« Ki-67 antigen ») sont des marqueurs classiques de la prolifération cellulaire permettant d'identifier les cellules en prolifération de l'épithélium intestinal (***Figure 4A***) (*Elmentaite et al., 2021*). Au fur et à mesure de leur migration vers le sommet des villosités intestinales, les cellules TA se divisent 4 à 5 fois et le destin sécrétoire ou absorbant des cellules progénitrices est déterminé dans cette zone d'amplification de transit principalement sous influence de la signalisation Notch (*van der Flier and Clevers, 2009; Date and Sato, 2015; Heppert et al., 2021*). Les cellules progénitrices absorbantes ou sécrétoires se différencient progressivement au cours de leur migration en cellules épithéliales spécialisées (***Figure 3***) (*van der Flier and Clevers, 2009*). Une fois différenciées, les cellules poursuivent leur migration hors de la crypte pour subir l'anoïkis au sommet des villosités et être rejetées dans la lumière intestinale (***Figure 3***) (*Sato et al., 2009; Date and Sato, 2015; Gehart and Clevers, 2019*). Ce système de migration des cellules permet d'isoler et de protéger physiquement les cellules souches au fond des cryptes et de n'exposer que brièvement les cellules différenciées à l'environnement luminal de l'intestin (*Gehart and Clevers, 2019*).

II.C. Les cellules différenciées de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal comprend 6 types principaux de cellules matures dérivées des cellules souches et appartiennent à la lignée absorbante (entérocytes et cellules M) ou à la lignée sécrétoire (cellules de Paneth, cellules en gobelet, cellules entéroendocrines et cellules Tuft) (*Gehart and Clevers, 2019*). Chaque type cellulaire possède des fonctions spécialisées et essentielles aux fonctions de l'épithélium intestinal (*présentées dans la partie IV*). Dans cette partie, les différents types cellulaires seront présentés ainsi que quelques exemples de gènes marqueurs utilisés dans la partie expérimentale de la thèse.

II.C.1. Les cellules de la lignée absorbante

- **Les entérocytes**

Les **cellules absorbantes** sont appelées entérocytes dans l'intestin grêle et colonocytes au niveau du côlon. Ces cellules sont hautes et étroites (***Figure 4B***) et constituent le type cellulaire le plus abondant puisqu'elles constituent plus de 70 % des cellules de l'épithélium intestinal (***Figure 5***) (*Randall et al., 2011; Pelaseyed et al., 2014*). Ces cellules possèdent des microvillosités à leur surface apicale, formant une structure appelée **bordure en brosse** permettant d'augmenter leur surface d'absorption (*Dutton et al., 2019*). Les entérocytes sont recouverts d'une fine couche de gel de glycoprotéines transmembranaires appelé **glycocalyx** (*détaillé dans la partie IV.C.2*) d'une épaisseur de l'ordre du

micromètre et formant une barrière physique contre les micro-organismes (*Johansson et al., 2011; Pelaseyed et al., 2014*). Il existe des marqueurs spécifiques des cellules absorbantes de chaque segment. La villine 1 (**VIL1**) est localisée spécifiquement au niveau de la bordure en brosse des entérocytes au niveau de l'épithélium intestinal et est largement utilisée comme marqueur des entérocytes (*Ubelmann et al., 2013*). Les gènes des anhydrases carboniques (CA : « carbonic anhydrases ») 1 et 2 (**CA1** et **CA2**) sont utilisés comme gènes marqueurs des colonocytes, en lien avec leur rôle dans l'absorption ionique (*détaillé dans la partie IV.A.*) (*Pan et al., 2007*). L'aquaporine 8 (**AQP8**) est un transporteur d'eau, également marqueur des colonocytes (*Burclaff et al., 2022*).

- **Les cellules M**

Les cellules M (« microfold ») sont rares et localisées au niveau des plaques de Peyer et des follicules lymphoïdes principalement localisé au niveau de l'iléon et du côlon, et possèdent un rôle important dans l'induction de réponses immunitaires (*Neutra et al., 2001; Mabbott et al., 2013*). Ces cellules sont hautement spécialisées dans le transfert par phagocytose et transcytose de macromolécules, d'antigènes et de micro-organismes de la lumière intestinale vers la membrane basale où se situe une poche intra-épithéliale où sont localisées diverses populations de cellules immunitaires (*Mabbott et al., 2013*).

II.C.2. Les cellules de la lignée sécrétoire

Les cellules différenciées de la lignée sécrétoire sont moins abondantes que les cellules absorbantes (***Figure 5***) (*Dutton et al., 2019*). Les cellules progénitrices sécrétoires expriment le **facteur de transcription ATOH1** (« Atonal BHLH Transcription Factor 1 », ou *Math1* ou *Hath1*) (*Yang et al., 2001; VanDussen et al., 2012; Sancho et al., 2015*).

- **Les cellules en gobelet**

Les **cellules caliciformes**, ou cellules en gobelet ou cellules productrices de mucus, sont les cellules les plus abondantes de la lignée sécrétoire (*Gehart and Clevers, 2019*) et constituent le deuxième type cellulaire différencié le plus abondant au niveau de l'épithélium intestinal après les cellules absorbantes (***Figure 5***) (*Dutton et al., 2019*). La proportion de cellules en gobelet augmente le long de l'axe proximal-distal de l'intestin du duodénum (4%) vers le côlon (16 %) (*van der Flier and Clevers, 2009; Grondin et al., 2020*).. Ces cellules sont spécialisées dans la production et la sécrétion du mucus protégeant la surface de l'intestin (*détaillé dans la partie IV.C.2*) (*van der Flier and Clevers, 2009; Dutton et al., 2019*). Les cellules en gobelet sont caractérisées par la présence de granules de sécrétion contenant principalement des mucines et notamment la mucine 2 (**MUC2**) couramment utilisée comme marqueur des cellules en gobelet (***Figure 4***). Au-delà de leur rôle dans la sécrétion du mucus, les cellules en gobelet joueraient également un rôle important dans l'induction de défenses immunitaires, en particulier en contribuant à l'absorption de composés luminaux (*Knoop and Newberry, 2018*). La différenciation des cellules en gobelet est contrôlée par les facteurs de transcription **SPDEF** (« SAM Pointed Domain Containing ETS Transcription Factor ») (***Figure 6***) et **KLF4** (« Krüppel-like factor 4 ») (*Katz et al., 2002; Clevers, 2013; Johansson and Hansson, 2016*).

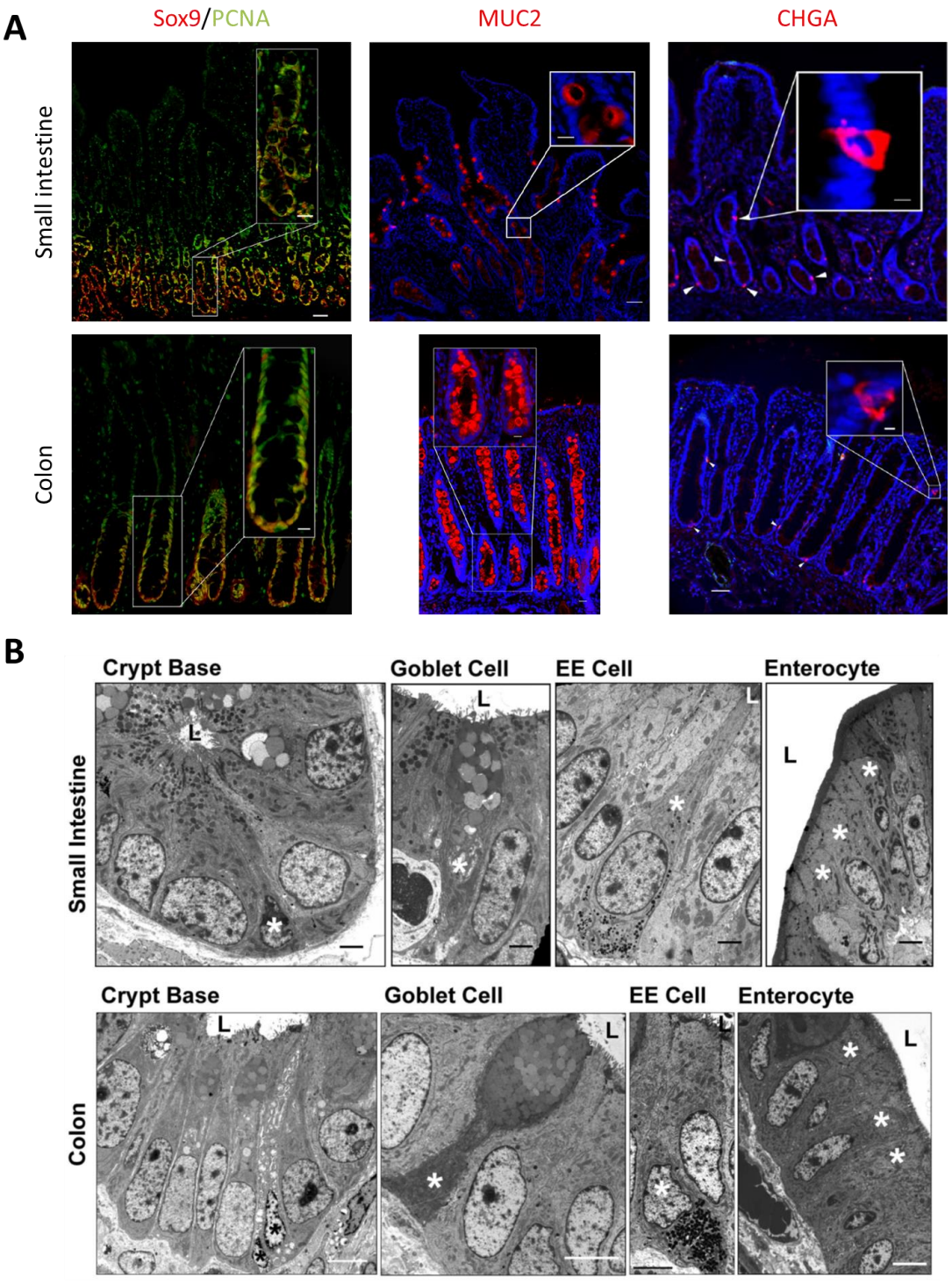


FIGURE 4 : TYPES CELLULAIRES PRESENTS DANS L'EPITHELIUM INTESTINAL CHEZ LE PORC

(A) Epithélium intestinal du jéjunum et du côlon de porc observé en microscopie confocale. Les observations illustrent la localisation de marqueurs des cellules souches (SOX9) et de la prolifération (PCNA), des cellules en gobelet (MUC2) et des cellules entéroendocrines (CHGA). **(B) Observation de l'épithélium intestinal du jéjunum et du côlon chez le porc en microscopie électronique à transmission.** Des cellules souches (repérées par une étoile sur les observations à la base des cryptes, « Crypt Base »), des cellules en gobelet contenant les granules de mucines, des cellules entéroendocrines (« EE Cell ») contenant des vésicules au pôle basal et des entérocytes ont été observées dans l'épithélium intestinal du porc. Adapté de Gonzalez et al. (2013).

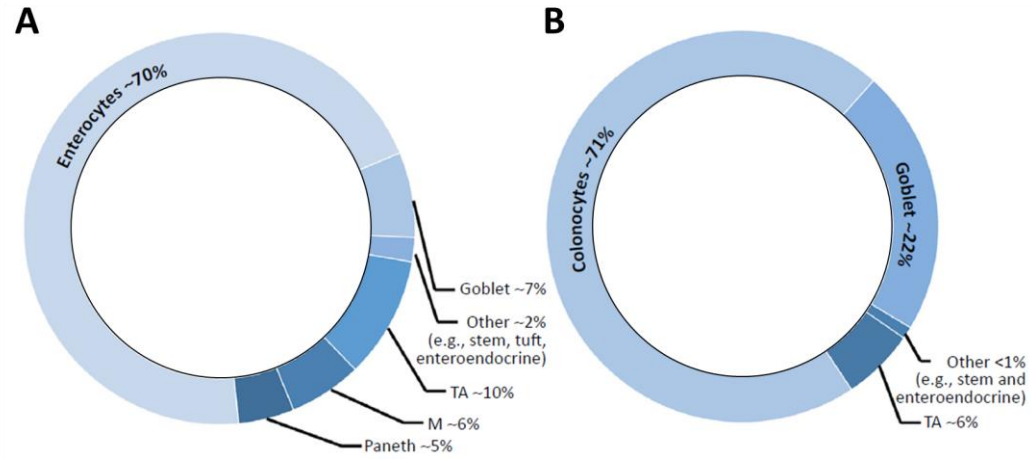


FIGURE 5 : PROPORTION DES DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES AU NIVEAU DE L'EPITHELIUM INTESTINAL HUMAIN
Proportion des types cellulaires au niveau de l'épithélium de l'intestin grêle (A) et du côlon (B). TA : « transit-amplifying ». Adapté de Dutton et al. (2019).

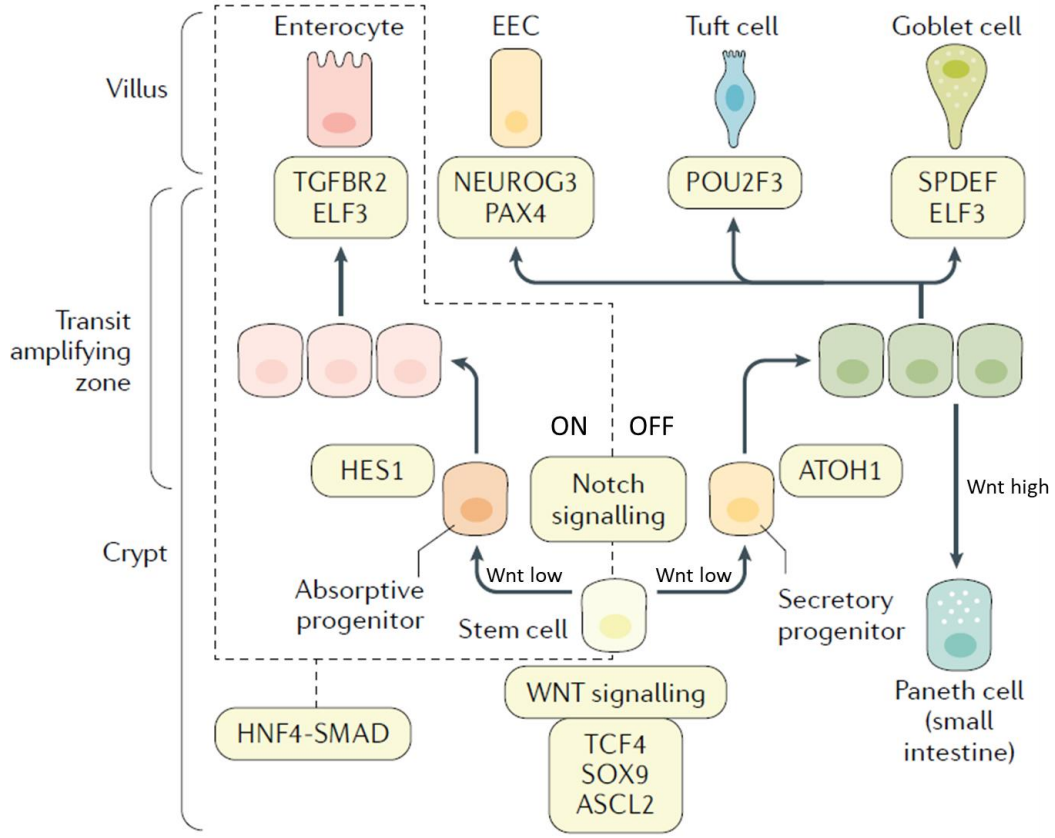


FIGURE 6 : VOIES DE SIGNALISATION ET FACTEURS DE TRANSCRIPTION IMPLIQUES DANS L'IDENTITE DES CELLULES DE L'EPITHELIUM INTESTINAL
Les principales voies de signalisations et facteurs de transcriptions impliqués dans l'identité des cellules épithéliales intestinales sont présentés. Adapté de Heppert et al. (2021).

- **Les cellules entéroendocrines**

Les **cellules entéroendocrines** sont rares dans l'épithélium (environ 1%) et sont présentes dans tout le tractus intestinal (***Figure 5***) (*van der Flier and Clevers, 2009; Gribble and Reimann, 2016; Dutton et al., 2019*). La surface apicale de ces cellules est recouverte de microvillosités en contact direct avec l'environnement luminal de l'intestin (*Gribble and Reimann, 2016*). La surface basale de certaines cellules entéroendocrines intestinales forme une structure appelée neuropode qui pourrait permettre une communication avec le système nerveux entérique. Des vésicules de sécrétion contenant des hormones sont présentes au niveau du pôle basal des cellules entéroendocrines. Ces cellules jouent un rôle dans le contrôle local de la motilité intestinale, dans la régulation de la digestion et de l'absorption des aliments et dans le contrôle métabolique via une action notamment sur la satiété et l'appétit (*Gribble and Reimann, 2016*). Les cellules entéroendocrines exercent leurs rôles via la sécrétion d'hormones peptidiques en réponse à des stimuli (*exemple :* présence de nutriments dans la lumière intestinale). Ces cellules sécrètent par exemple la cholécystokinine (**CCK**), le peptide YY (**PYY**) et le glucagon (**GCG**) (*van der Flier and Clevers, 2009; Gribble and Reimann, 2016*). Le type d'hormones sécrétées varie en fonction de la localisation des cellules entéroendocrines dans l'intestin et donc selon leur exposition à différents stimuli luminaux. Par exemple, les cellules exprimant CCK sont plus abondantes dans l'intestin proximal alors que celles exprimant PYY sont plus abondantes dans l'intestin distal (*Thompson et al., 2018*). Il existe environ 15 sous-types différents de cellules entéroendocrines, définis par leur morphologie et classés en fonction de l'hormone principale qu'elles produisent et par l'expression de gènes marqueurs spécifiques (*van der Flier and Clevers, 2009; Gribble and Reimann, 2016*). Le facteur de transcription neurogenin 3 (codé par le gène ***NEUROG3***) est nécessaire à la spécification du destin des cellules entéroendocrines (***Figure 6***) (*van der Flier and Clevers, 2009; Clevers, 2013; Gribble and Reimann, 2016*). La chromogranine A (**CHGA**) est considérée comme un marqueur efficace de toutes les cellules entéroendocrines le long de l'intestin (***Figure 4A***) (*Engelstoft et al., 2015*).

- **Les cellules de Paneth**

Contrairement aux autres types cellulaires, les **cellules de Paneth** différenciées migrent vers le fond des cryptes où elles résident intercalées avec les cellules souches (***Figure 3***) (*van der Flier and Clevers, 2009; Date and Sato, 2015*). Ce type cellulaire n'est pas présent au niveau de l'épithélium du côlon, cependant des cellules avec un rôle similaire seraient présentes à la base des cryptes du côlon. Ces cellules sont appelées « cellules sécrétoires de la crypte profonde » et sont caractérisées par leur expression du gène « Regenerating Family member 4 » (**REG4**) (*van der Flier and Clevers, 2009; Date and Sato, 2015; Gehart and Clevers, 2019*). Les cellules de Paneth sont des cellules différenciées avec une durée de vie plus longue (de 2 à 3 mois) que les autres types cellulaires (*van der Flier and Clevers, 2009; Date and Sato, 2015*). Les cellules de Paneth jouent un rôle important à la fois pour le maintien des cellules souches en produisant des protéines essentielles de leur niche mais aussi dans l'immunité innée (*van der Flier et al., 2009; Merker et al., 2016*). En effet, les cellules de Paneth possèdent au niveau de leur pôle apical des granules sécrétoires qui contiennent des peptides antimicrobiens (tels que les lysozymes et les défensines) protégeant ainsi les cryptes intestinales et donc les cellules souches des micro-organismes (*Date and Sato, 2015; Merker et al., 2016*). L'expression du facteur de transcription SOX9 (également marqueur des cellules souches) est important pour la différenciation des cellules de Paneth (*Bastide et al., 2007; Clevers, 2013*). Chez le porc, l'existence des cellules de Paneth dans l'intestin grêle est controversée bien qu'il existe des cellules épithéliales porcines exprimant des peptides antimicrobiens tel que le lysozyme et dont les caractéristiques morphologiques ressemblent à celles décrites chez l'homme et la souris (*van der Hee et al., 2018*).

- **Les cellules Tuft**

Les **cellules Tuft** sont rares (environ 0,5% des cellules épithéliales intestinales) et seraient légèrement plus abondantes dans la partie distale de l'intestin grêle que dans la partie proximale (***Figure 5***) (*Banerjee et al., 2018*). Les cellules Tuft ont une morphologie unique caractérisée par un corps cylindrique qui se rétrécit aux extrémités basale et apicale (*Banerjee et al., 2018*). Ces cellules ont de longues microvillosités au niveau du pôle apical formant une touffe (« Tuft ») (*Banerjee et al., 2018*). Les fonctions des cellules Tuft sont encore peu connues mais ces cellules agiraient comme des capteurs présentant des composés luminaux au système immunitaire et jouant un rôle dans les mécanismes de réaction immunitaire contre les parasites (*Banerjee et al., 2018*). Ces cellules ne semblent pas avoir été décrites chez le porc.

III. Voies de signalisation impliquées dans le renouvellement et la différenciation de l'épithélium

La **niche des cellules souches** désigne le microenvironnement à la base des cryptes dans lequel résident les cellules souches. Cette niche est définie par l'ensemble des signaux fournis aux cellules souches par le mésenchyme sous-épithélial et par les cellules épithéliales voisines des cellules souches, notamment les cellules de Paneth (***Figure 7***) (*van der Flier and Clevers, 2009; Gehart and Clevers, 2019*). L'identité des cellules épithéliales est liée à leur position dans la crypte, en lien avec l'existence de gradients d'activations de voies de signalisations présentées ici.

III.A. La voie de signalisation Wnt/β-caténine

La **voie de signalisation canonique de Wnt dépendante de la β-caténine** est la principale voie impliquée dans le renouvellement de l'épithélium intestinal et dans le maintien de l'identité des cellules souches (*Sato et al., 2011b; Nusse and Clevers, 2017; Gehart and Clevers, 2019*). En l'absence de ligand de la voie Wnt, la β-caténine est constamment dégradée par un complexe de dégradation composé notamment du suppresseur de tumeur *adenomatous popyposis coli* (APC) et de la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3) (**Figure 8A**) (*van der Flier and Clevers, 2009; Nusse and Clevers, 2017*). La dégradation de la β-caténine empêche sa translocation vers le noyau réprimant ainsi les gènes cibles de la voie Wnt (*van der Flier and Clevers, 2009; Nusse and Clevers, 2017*). Au contraire, lorsque des ligands Wnt se fixent à la surface des cellules aux récepteurs Frizzled et LRP5/6, la dégradation de la β-caténine est inhibée, ce qui entraine son transfert vers le noyau de la cellule pour activer les gènes cibles de la voie Wnt (*Nusse and Clevers, 2017*). Les principaux gènes cibles de la voie Wnt induisent la prolifération et maintiennent l'état indifférencié de cellules souches (*exemple :* le facteur de transcription *SOX9*) (*Barker, 2014; Date and Sato, 2015*). Une inhibition de la voie Wnt conduit à l'arrêt de la prolifération des cellules souches. Les ligands Wnt sont hydrophobes et agissent donc essentiellement comme des signaux à courte portée (*Nusse and Clevers, 2017; Gehart and Clevers, 2019*). La grande majorité du transfert des signaux de cette voie se fait donc par contact direct entre les cellules. Au niveau des cryptes intestinales, les ligands Wnt sont fournis par les cellules du mésenchyme et par les cellules de Paneth (***Figure 7***). Lors de la migration vers la zone d'amplification de transit, les cellules emportent avec elles les ligands Wnt fixés à leur récepteur. A chaque division cellulaire au niveau de la zone TA, la quantité de ligand Wnt en surface est réduite de moitié créant ainsi un gradient de Wnt décroissant du bas vers le haut de la crypte, où il est progressivement perdu (***Figure 7***).

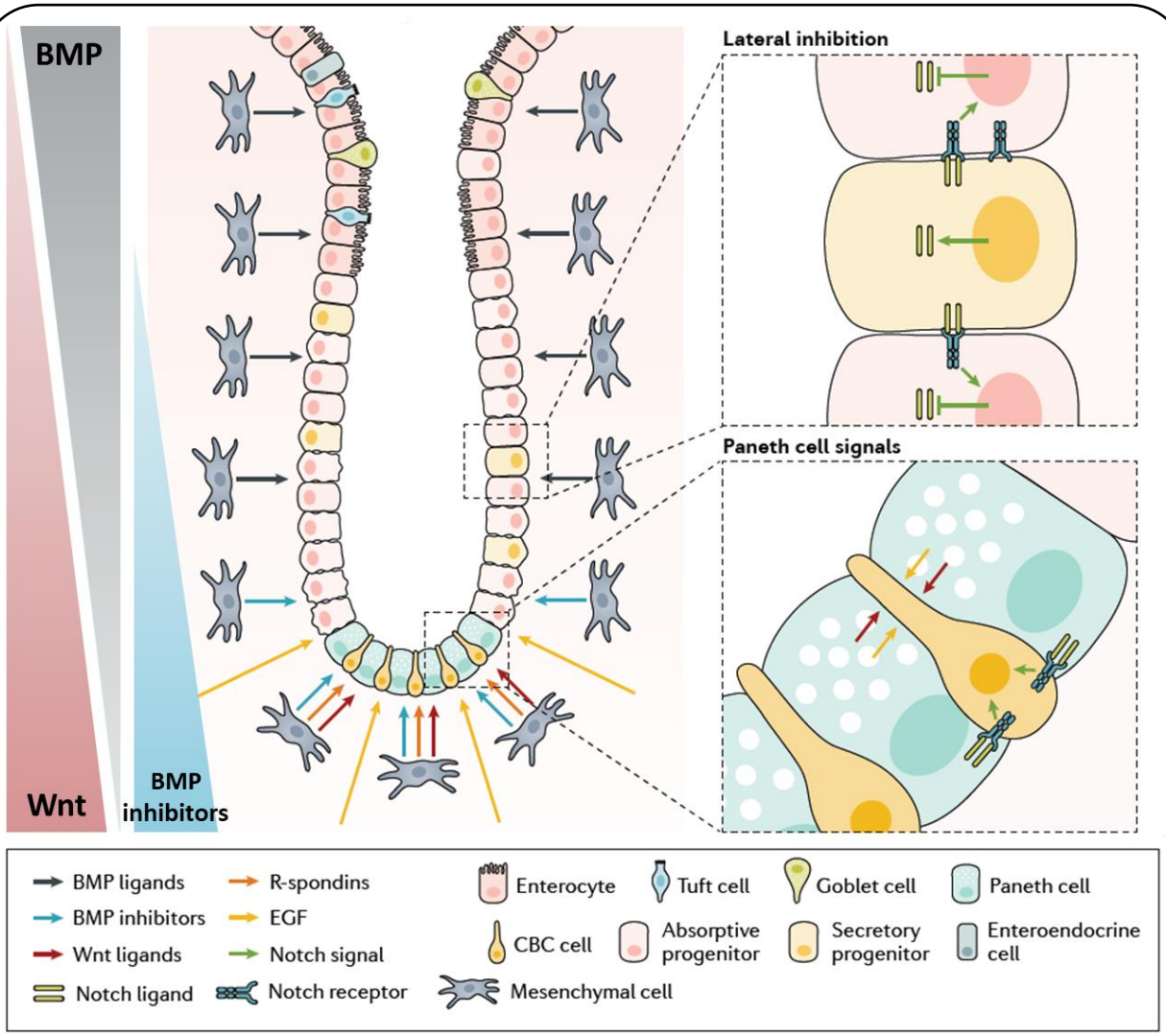


FIGURE 7 : PRINCIPALES VOIES DE SIGNALISATION ET SOURCES DES SIGNAUX DANS LES CRYPTES EPITHELIALES

Deux gradients s'opposent le long de l'axe crypte-lumière intestinale : la signalisation de la voie Wnt et celle des protéines morphogénétiques osseuses (BMP). Au fond de la crypte, les ligands Wnt et les R-spondines sont sécrétés par les cellules mésenchymateuses et par les cellules de Paneth, ce qui induit une activité élevée de la voie WNT dans les cellules souches à la base de la crypte (« CBC cells »). En raison de la faible solubilité des signaux Wnt, la majorité du transfert de signal se produit par contact direct de cellule à cellule, ce qui crée un gradient de disponibilité de Wnt et diminue ainsi l'activation de la voie Wnt vers le haut de la crypte. Un gradient d'activation de la voie BMP croissant depuis la base des cryptes s'oppose directement à la voie Wnt. Les cellules mésenchymateuses inter-cryptes et inter-villosités sécrètent des BMP qui induisent la différenciation des cellules épithéliales migrant vers le sommet des villosités de l'intestin. Pour protéger le compartiment des cellules souches de ces signaux, les myofibroblastes et les cellules musculaires lisses autour du fond de la crypte sécrètent des protéines inhibitrices de BMP telles que Noggin. Le facteur de croissance épidermique (EGF), produit par les cellules de Paneth et le mésenchyme environnant, se lie à son récepteur fortement exprimé sur les cellules souches, favorisant ainsi la prolifération. Les cellules de Paneth fournissent également des ligands Notch essentiels aux cellules souches. Plus haut dans la crypte, la signalisation Notch contrôle le rapport entre les progéniteurs absorbants et sécrétoires par inhibition latérale. Lorsque les ligands Notch sont exprimés dans une cellule progénitrice sécrétoire, ils se lient aux récepteurs Notch dans toutes les cellules environnantes. Cette liaison détermine le destin vers la lignée absorbante et empêche l'expression des ligands de Notch dans ces cellules, garantissant ainsi l'équilibre entre les différents types cellulaires. Adapté de Gehart and Clevers (2019).

La signalisation Wnt est **potentialisé par les R-spondines** fournies par les cellules du mésenchyme (***Figure 7***) (*Carmon et al., 2011; Gehart and Clevers, 2019*). Les R-spondines constituent une famille de 4 protéines sécrétées par les cellules du mésenchyme qui se lient aux récepteurs de la famille LGR. Les cellules souches intestinales expriment les récepteurs LGR4 et LGR5 (*Gehart and Clevers, 2019*). En l'absence de R-spondines, les récepteurs Frizzled se renouvellent rapidement, ce qui réduit la fixation de Wnt à la surface des cellules. L'activation des récepteurs LGR par les R-spondines augmente la quantité de récepteurs Frizzled à la surface des cellules souches et amplifie ainsi la sensibilité aux ligands Wnt (**Figure 8A**) (*Gehart and Clevers, 2019*).

III.B. La voie de signalisation Notch

La **voie de signalisation Notch** est une autre voie de signalisation très importante pour maintenir l'état indifférencié et prolifératif des cellules souches (*van der Flier and Clevers, 2009; VanDussen et al., 2012; Date and Sato, 2015*). Il s'agit d'une voie de signalisation à très courte portée puisque le ligand et le récepteur sont des protéines transmembranaires (***Figure 8B***) (*Sancho et al., 2015; Gehart and Clevers, 2019*). Cette voie nécessite donc un contact direct entre deux cellules : l'une exprimant des ligands Notch (5 ligands comprenant DLL1, DLL3, DLL4, Jagged-1 et Jagged-2), l'autre exprimant des récepteurs Notch (4 types de récepteur transmembranaire : Notch 1-4). Lorsque qu'un ligand Notch se lie à un récepteur Notch, le domaine intracellulaire du récepteur Notch (NICD : « Notch intracellular domain ») est libéré par la γ-sécrétase. Le NICD peut alors transloquer vers le noyau et agir sur la transcription de ses gènes cibles (***Figure 8B***) (*Gehart and Clevers, 2019*). Au niveau des cryptes intestinales, les cellules souches expriment les récepteurs de la voie Notch, tandis que les cellules de Paneth expriment les ligands DLL1 et DLL4 (***Figure 7***) (*Date and Sato, 2015*). L'activation des récepteurs de Notch des cellules souches par les cellules de Paneth active l'expression des gènes cibles de cette voie et notamment le gène *OLMF4*, marqueur des cellules souches (*VanDussen et al., 2012*).

La voie Notch est également impliquée dans l'orientation de la différenciation épithéliale. En effet, la voie Notch entraine des destins opposés (cellules absorbantes ou sécrétrices) dans les cellules adjacentes par un processus appelé **mécanisme d'inhibition latérale** (*Sancho et al., 2015; Gehart and Clevers, 2019*) (***Figure 7***). Le NICD réprime les gènes codant pour les ligands de la voie Notch ce qui réduit la production de ligands Notch et donc l'activation de Notch dans les cellules voisines (*Sancho et al., 2015*). Les gènes de la famille Hes (« hairy enhancer of split ») codant pour des répresseurs transcriptionnels sont des cibles directes de la voie Notch dont ***HES1*** est le mieux caractérisé (*van der Flier and Clevers, 2009; Ueo et al., 2012; Sancho et al., 2015*). HES1 réprime l'expression du facteur de transcription *ATOH1*, ce qui réprime la différenciation vers la lignée sécrétoire (***Figure 6***) (*Ueo et al., 2012; Clevers, 2013; Sancho et al., 2015*). Dans la zone d'amplification de transit (TA), les cellules progénitrices sécrétoires expriment le ligand Notch DLL1 à leur surface et activent ainsi les récepteurs Notch dans les cellules voisines qui se différencient alors en cellules absorbantes (***Figure 7***) (*Gehart and Clevers, 2019*). La voie de signalisation Notch joue donc un rôle crucial dans le maintien de l'équilibre entre les lignages absorbants et sécrétoires (*Heppert et al., 2021*).

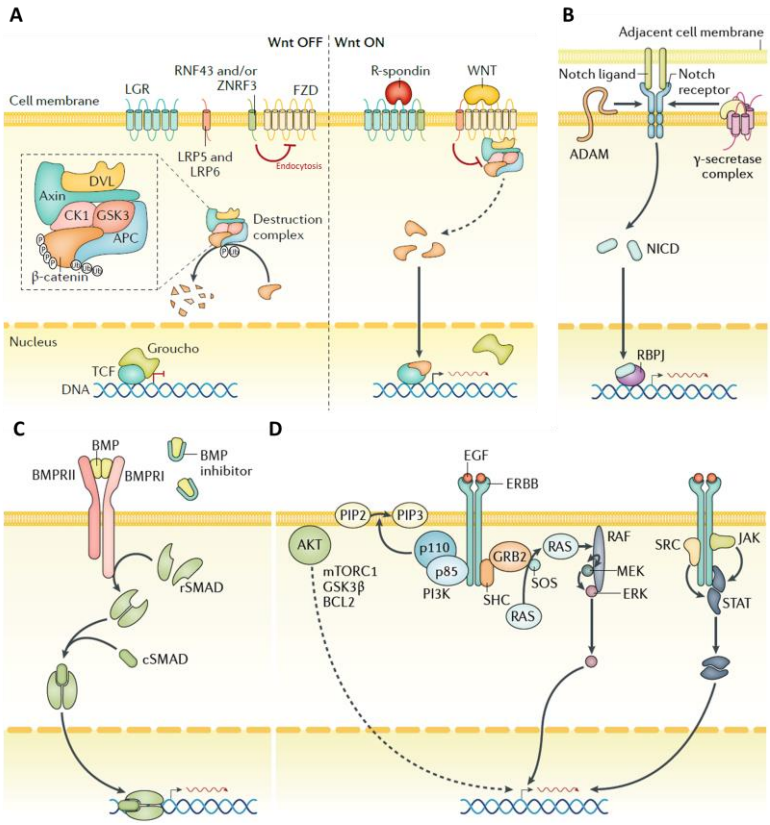


FIGURE 8 : MECANISME D'ACTION DES PRINCIPALES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS LE RENOUVELLEMENT ET LA DIFFERENCIATION DE L'EPITHELIUM INTESTINAL

(A) En l'absence de R-spondine, le récepteur Frizzled (FZD) est continuellement dégradé. De même, si aucun ligand Wnt n'est lié à FZD, le complexe de dégradation décompose la β-caténine. Lorsque que les ligands de Wnt se lient aux récepteurs FZD, le complexe de destruction est inhibé et la β-caténine s'accumule, pénètre dans le noyau et entraîne la transcription de gènes cibles. L'activation soutenue de la voie Wnt n'est possible qu'en présence de R-spondine, car sa liaison aux récepteurs de la famille LGR stabilise ainsi l'expression de FZD. **(B)** La signalisation Notch est initiée par la liaison des ligands Notch aux récepteurs Notch entrainant la libération du domaine intracellulaire Notch (NICD) dans le cytoplasme. Le NICD transloque vers le noyau, où il active l'expression de ses gènes cibles (par exemple *HES1*, *OLMF4*). **(C)** La liaison de la protéine morphogénétique osseuse (BMP) entraine la translocation de SMAD dans le noyau où ce complexe régule l'expression de gènes cibles. La signalisation BMP peut être inhibée par la séquestration des BMP par des protéines telles que Noggin. **(D)** L'activation des récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR) par l'EGF permet l'activation des voies de signalisation PI3/AKT, MAPK/ERK et JAK/STAT. Adapté de Gehart and Clevers (2019).

III.C. La voie de signalisation des BMP

La **voie de signalisation des BMP** (« Bone Morphogenic Protein ») est impliquée dans la différenciation des cellules épithéliales (*Date and Sato, 2015*). Les BMP sont des membres de la superfamille des TGF-β (« Transforming Growth Factor β ») (*Gehart and Clevers, 2019*). La liaison des BMP à leur récepteurs entraine l'activation des facteurs de transcription SMAD (***Figure 8C***) (*Snippert et al., 2010; Gehart and Clevers, 2019*). Dans l'intestin BMP2 et BMP4 sont les principaux ligands des récepteurs BMP et sont sécrétés par les cellules mésenchymateuses inter-cryptes et inter-villosités (*Gehart and Clevers, 2019*). La voie des BMP s'oppose aux signaux prolifératifs présents dans la niche des cellules souches intestinales et favorise ainsi la différenciation cellulaire (*Gehart and Clevers, 2019*). Afin de maintenir l'équilibre entre prolifération et différenciation, la signalisation BMP est finement régulée pour

maintenir un gradient croissant de la base des cryptes vers la lumière (***Figure 7***). Pour cela, la zone des cellules souches est protégée par des antagonistes des BMP tels que Noggin, sécrétée par les cellules du mésenchyme (***Figure 7***) (*van der Flier and Clevers, 2009; Gehart and Clevers, 2019*).

III.D. La voie de signalisation EGF

L'EGF (« Epidermal Growth Factor ») est un facteur de croissance majeur dans les tissus épithéliaux et est principalement produit par les cellules de Paneth dans l'intestin grêle (*Date and Sato, 2015; Gehart and Clevers, 2019*). Lors de la liaison à son récepteur (EGFR), l'EGF active les voies de signalisation JAK/STAT, MAPK/ERK et PI3K/Akt permettant une activation de la prolifération des cellules (***Figure 8D***). La voie EGF est essentielle pour le renouvellement de l'épithélium intestinal mais pas pour le maintien de l'identité des cellules souches, contrairement aux voies de signalisation Wnt et Notch.

III.E. Régionalisation de l'épithélium intestinal

L'identité des cellules épithéliales est définie par leur position dans l'axe crypte-villosité mais aussi par leur localisation dans l'intestin le long de l'axe céphalo-caudal, en lien avec la spécialisation fonctionnelle de chaque segment. Cette identité régionale de l'épithélium est spécifiée au cours du développement embryonnaire par l'activation de programmes transcriptionnels dans l'endoderme (*Heppert et al., 2021*). Cette régionalisation débute donc avant que l'intestin ne reçoivent des signaux environnementaux issus de l'alimentation ou de la colonisation par le microbiote (*Heppert et al., 2021*). Par exemple, le facteur de transcription CDX2 (« Caudal Type Homeobox 2 ») est exprimé spécifiquement dans l'intestin grêle et le côlon (***Figure 9***), contrairement à SOX2 qui est exprimé dans la partie œso-gastrique (*Thompson et al., 2018; Heppert et al., 2021*). L'expression de ces facteurs de transcription pionniers favorise l'expression ultérieure de facteurs de transcription régionaux spécifiques à chaque lignage cellulaire (*Heppert et al., 2021*). Les facteurs de transcription GATA jouent un rôle important dans la régionalisation de l'épithélium intestinal préalablement établie par CDX2. Par exemple, le facteur de transcription GATA4 est activé uniquement dans l'intestin proximal (duodénum et jéjunum) et non dans l'intestin distal (iléon et côlon) (***Figure 9***) (*Thompson et al., 2018; Heppert et al., 2021*). Les voies de signalisation WNT et BMP jouent également un rôle clé dans la régionalisation de l'intestin (*Thompson et al., 2018*). Enfin, l'identité des cellules épithéliales selon leur localisation dans l'intestin implique des régulations épigénétiques telles que des modifications de structure de la chromatine et de la méthylation de l'ADN ainsi que des modifications post-traductionnelles au niveau des histones (*Heppert et al., 2021*).

En résumé

L'épithélium intestinal est formé d'une monocouche de cellules renouvelées en permanence par des cellules souches situées à la base des cryptes. Après une phase de prolifération, les cellules épithéliales migrent vers le sommet des villosités de l'intestin et se différencient en cellules absorbantes ou sécrétrices (cellules de Paneth, cellules en gobelet, cellules entéroendocrines, cellules Tuft). Ces processus sont principalement régulés par les voies de signalisation Wnt, BMP, Notch et EGF dont le niveau d'activation varie en fonction de la localisation le long de l'axe crypte-villosité. L'identité des cellules épithéliales est également déterminée par leur localisation dans l'axe antéro-postérieur de l'intestin, sous influence de facteurs de transcriptions et de régulations épigénétiques activés précocement dans le développement.

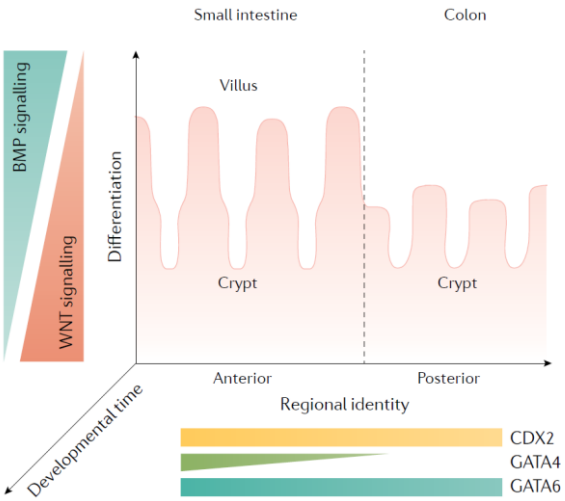


FIGURE 9 : REGULATION DE L'IDENTITE DES CELLULES EPITHELIALES EN FONCTION DE LEUR LOCALISATION DANS L'INTESTIN

L'identité régionale des cellules épithéliales est déterminée par l'expression différentielle de facteurs de transcription. CDX2 initie la régionalisation de l'intestin et le facteur de transcription GATA4 est nécessaire pour déterminer la limite entre l'intestin antérieur et postérieur. D'après Heppert et al. (2021).

IV. Fonctions de l'épithélium intestinal

Les trois principales fonctions de l'épithélium intestinal sont : (1) la sécrétion et l'absorption d'eau et d'électrolytes, (2) la digestion et l'absorption des nutriments, (3) la fonction de barrière contre les micro-organismes et les composants nocifs présents dans la lumière intestinale. L'ensemble de ces fonctions nécessite la mise en place d'une **perméabilité sélective** pour absorber ou sécréter les composés d'intérêt tout en empêchant l'entrée de composés indésirables. Cette perméabilité de l'épithélium peut être **transcellulaire** (au travers des cellules) ou **paracellulaire** (entre les cellules).

IV.A. Sécrétion et absorption d'eau et d'électrolytes

La **sécrétion et l'absorption d'ions et d'eau** dans l'intestin permet de couvrir les besoins de l'organisme pour ces éléments et de maintenir l'environnement luminal dans des conditions optimales pour les processus de digestion et d'absorption des nutriments. Cette fonction permet aussi de protéger l'organisme par exemple en régulant les propriétés de la couche de mucus (*Moeser and Blikslager, 2007; Heo et al., 2013*).

Le **flux d'eau** peut s'effectuer par la voie paracellulaire, cependant la présence de transporteurs d'eau (aquaporines, AQP) exprimés par les cellules absorbantes facilite le flux d'eau transcellulaire (*He and Yun, 2010; Zhu et al., 2016*). Il existe 13 isoformes des AQP (0 à 12), toutes exprimées dans l'intestin mais dont les niveaux d'expression diffèrent en fonction de la localisation le long du tractus intestinal. Lors des études réalisées au cours de cette thèse nous avons notamment étudié l'expression du gène ***AQP8***, marqueur des cellules épithéliales absorbantes matures et plus exprimé au niveau du côlon que de l'intestin grêle (*Zhu et al., 2016; Burclaff et al., 2022*).

Les principaux **ions sécrétés** au niveau de l'épithélium intestinal sont le chlore (Cl^-) et le sodium (Na^+). Les mouvements de ces ions sont associés à des flux d'eau par des mécanismes osmotiques (*Moeser*

and Blikslager, 2007). Les cellules épithéliales de la base des cryptes expriment la protéine canal **CFTR** (« cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ») qui permet la sécrétion des ions Cl^- et bicarbonate (HCO_3^-). Cette sécrétion entraine un flux d'eau permettant d'évacuer des composés potentiellement toxiques hors de la crypte (*Liu et al., 2012; Gehart and Clevers, 2019*). Un fonctionnement anormal du CFTR assèche l'environnement luminal ce qui conduit notamment à une perturbation de la structure du mucus (*Moeser and Blikslager, 2007*). Le canal CFTR est fortement exprimé au niveau des cryptes et présente un gradient d'expression décroissant le long de l'axe crypte/villosité (*Liu et al., 2012*). L'expression de ce canal présente également un gradient décroissant le long de l'axe céphalo-caudal de l'intestin grêle (*Strong et al., 1994; Liu et al., 2012*). Le transport des ions Na^+ est médié principalement par l'échangeur Na^+/H^+ de type 3 (**NHE3**) exprimé au pôle apical des cellules absorbantes (*He and Yun, 2010*). Le transport des ions Na^+ est généralement couplé au transport du glucose et d'acides aminés. Les anhydrases carboniques (CA : « carbonic anhydrases ») sont des enzymes jouant un rôle important dans les échanges ioniques en raison de leur rôle dans l'hydratation réversible du dioxyde de carbone en ions bicarbonates ($CO_2 + H_2O \Leftrightarrow HCO3^- + H^+$) (*Kivelä et al., 2005*) (***Figure 10***). Au cours de cette thèse, nous avons mesuré l'expression des gènes **CA1** et **CA2**. Ces enzymes sont connues pour être plus exprimées dans les colonocytes que dans les entérocytes (*Kivelä et al., 2005*).

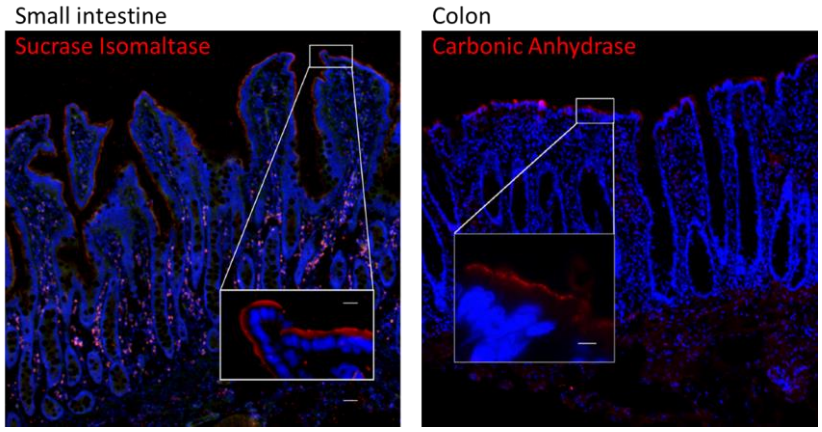


FIGURE 10 : MARQUEURS DES CELLULES ABSORBANTES DE L'INTESTIN GRELE ET DU COLON CHEZ LE PORC
L'observation d'immunomarquages par microscopie confocale montre en rouge l'expression au pôle apical des cellules absorbantes de la sucrase isomaltase dans l'intestin grêle et de l'anhydrase carbonique dans le côlon. Les noyaux sont marqués en bleu. D'après Gonzalez et al. (2013).

IV.B. Digestion, absorption et détection des nutriments

L'épithélium intestinal joue un rôle central dans la digestion et l'absorption des nutriments. Ces fonctions sont permises par des enzymes digestives et des transporteurs de nutriments dont l'expression varie le long de l'intestin, en lien avec la spécialisation fonctionnelle de chaque région (*Middendorp et al., 2014*). Ici, les principaux mécanismes impliqués dans la digestion et l'absorption des glucides, protéines et lipides par les cellules épithéliales sont brièvement présentés. De plus, quelques exemples de protéines jouant un rôle important dans ces processus et dont l'expression génique a été mesurée dans le cadre de cette thèse sont décrits.

Les **glucides** complexes apportés par l'alimentation sont dégradés en monosaccharides (*exemple :* glucose, galactose) ou en disaccharides (*exemple :* lactose, saccharose, maltose) dans la lumière intestinale par des enzymes digestives sécrétées telles que l'amylase (*Kiela and Ghishan, 2016*). Les disaccharides sont ensuite hydrolysés par des enzymes exprimées au pôle apical des cellules épithéliales absorbantes, telles que la lactase (**LCT**), la maltase et la sucrase isomaltase (**SI**) (*Kiela and Ghishan, 2016*) (***Figure 10***). Ces enzymes sont spécifiquement exprimées au niveau de l'intestin grêle et plus particulièrement au niveau du jéjunum (*Comelli et al., 2009; Middendorp et al., 2014*). Les cellules épithéliales absorbent ensuite les monosaccharides via des transporteurs spécifiques, par exemple via le transporteur **SGLT1** (SLC5A1) (« sodium-glucose co-transporter 1 ») pour le transport du glucose dépendant du Na^+, ou via les transporteurs **GLUT1** (SLC2A1) (« Glucose transporteur 1 ») et **GLUT2** (SLC2A2) (« Glucose transporteur 2 ») pour l'absorption facilitée du glucose (*Kiela and Ghishan, 2016*). Les transporteurs SGLT1 et GLUT2 sont plus exprimés dans l'intestin grêle que dans le gros intestin alors que l'inverse est observé pour GLUT1 (*Yoshikawa et al., 2011*).

Les **peptides** issus de la digestion des protéines peuvent être absorbés grâce au transporteur **PEPT1** (« Peptide transporter 1 ») principalement exprimé au niveau de l'intestin grêle (*Kiela and Ghishan, 2016*). Des peptidases telles que la Dipeptidyl Peptidase-4 (**DDP4**) sont également exprimées au niveau de la bordure en brosse des cellules absorbantes, particulièrement dans l'intestin grêle (*Olivares et al., 2018*). Des transporteurs, tels que SLC5A19 et SLC7A11, permettent l'absorption des **acides aminés** (*Böhmer et al., 2010; Lin et al., 2016*). Les **lipides** sont digérés par les enzymes pancréatiques dans la lumière intestinale avant d'être absorbés principalement dans le jéjunum par diffusion simple ou facilitée, notamment grâce à la protéine **CD36**. La phosphatase alcaline intestinale (**ALPI**) participe également au transport des lipides à travers la membrane apicale des cellules (*Lallès, 2010*). L'expression de cette enzyme est élevée au niveau du duodénum et diminue selon l'axe longitudinal de l'intestin pour atteindre des niveaux très faible dans le côlon. Les acides gras libres absorbés sont ensuite oxydés ou utilisés pour la synthèse de triglycérides dans les cellules épithéliales notamment grâces aux protéines de liaison des acides gras (FABP : « Fatty acid binding proteins »). **FABP1** et **FABP2** sont principalement exprimés au niveau de l'intestin proximal tandis que **FABP6** est principalement retrouvé au niveau de l'iléon (*Middendorp et al., 2014; Gajda and Storch, 2015*). Les acides biliaires sécrétés par le foie jouent un rôle majeur dans la digestion et l'absorption des lipides. Ces acides biliaires sont recyclés grâce à leur réabsorption dans la partie distale de l'intestin grêle (cycle entérohépathique). Au niveau des cellules épithéliales, la détection des acides biliaires régule le métabolisme via leur liaison à des récepteurs nucléaires, tel que le récepteur farnésoïde X (FXR ou **NR1H4**) principalement exprimé au niveau de l'iléon (*de Aguiar Vallim et al., 2013*).

IV.C. Fonction de barrière de l'épithélium intestinal

La monocouche de cellules épithéliales est la première ligne de défense de l'organisme contre les composés se trouvant dans la lumière de l'intestin (microbiote, pathogènes, antigènes alimentaires, toxines, etc.). La fonction de barrière de l'épithélium intestinal est notamment assurée par un réseau complexe de jonctions cellulaires. Cette barrière physique est renforcée par une couche protectrice de mucus et par la sécrétion de peptides antimicrobiens dans la lumière intestinale. Enfin, les cellules épithéliales jouent un rôle central dans l'immunité innée de l'intestin en raison de leur capacité à détecter et à lutter contre les micro-organismes tout en communiquant avec les cellules immunitaires spécialisées de la *lamina propria*.

IV.C.1. Jonctions cellulaires de l'épithélium intestinal

Les cellules épithéliales intestinales sont fortement polarisées. Les cellules adhèrent à la matrice extracellulaire (lame basale) via des intégrines exprimées au niveau de leur pôle basal (***Figure 11***). Une ceinture contractile d'actine est présente au pôle apical des cellules épithéliales et des filaments d'actine se propagent dans la bordure en brosse (*Dogterom and Koenderink, 2019*). Le contact entre les cellules épithéliales au niveau de l'épithélium intestinal se fait par trois classes de jonctions cellulaires : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes (*Groschwitz and Hogan, 2009; Garcia et al., 2018*). Ces différents types de jonction forment des connexions liant les éléments du cytosquelette des cellules adjacentes (*Garcia et al., 2018; Dogterom and Koenderink, 2019*). Les jonctions cellulaires jouent un rôle important dans le maintien de la polarité épithéliale, par exemple en s'opposant au transfert de protéines membranaires entre le pôle apical et basolatéral (*Bryant and Mostov, 2008; Groschwitz and Hogan, 2009*). Ces jonctions cellulaires jouent également un rôle majeur dans le contrôle de la **perméabilité paracellulaire** permettant le passage sélectif d'ions et de petites molécules entre les cellules en fonction de leurs tailles et de leurs charges (***Figure 11***) (*Wijtten et al., 2011*).

Les **jonctions serrées** encerclent chaque cellule épithéliale à proximité de la membrane apicale (***Figure 11***) (*Garcia et al., 2018*). Ces jonctions serrées sont les principales structures permettant de réguler la perméabilité paracellulaire des ions et des solutés. Elles sont composées de protéines transmembranaires formant des complexes homotypiques ou hétérotypiques entre cellules(*Zihni et al., 2016; Garcia et al., 2018*). L'**occludine** et certaines claudines réduisent la perméabilité paracellulaire (*exemple :* **Claudine 3**) alors que d'autres l'augmente (*exemple :* **Claudine 2**). Ces protéines se lient à des protéines adaptatrices cytoplasmiques, tels que les **zonula occludens** (ZO-1, -2, -3 ; ou TJP « Tight junction protein ») ou la **cinguline** (CGN) (***Figure 11***). Ces protéines adaptatrices se lient à leur tour au cytosquelette (*Yano et al., 2013; Garcia et al., 2018*).

Les **jonctions adhérentes** permettent de maintenir l'adhésion entre les cellules au niveau des membranes latérales (*Garcia et al., 2018*). Ce type de jonctions fait intervenir des cadhérines transmembranaires tel que la cadhérine épithéliale (**E-cadhérine**, codé par le gène *CDH1*). Les cadhérines de cellules voisines interagissent par leur extrémité extracellulaire ce qui permet de maintenir les contacts entre cellules (*Groschwitz and Hogan, 2009*). Les E-cadhérines forment des complexes avec des protéines adaptatrices, notamment avec les caténines, et se lient au cytosquelette d'actine (***Figure 11***) (*Groschwitz and Hogan, 2009; Garcia et al., 2018*). Les **desmosomes** comprennent des cadhérines transmembranaires de deux sous-types (la desmogléine et la desmocolline) qui interagissent avec des protéines adaptatrices formant des complexes importants pour le contact entres cellules au niveau de la membrane latérale (***Figure 11***) (*Groschwitz and Hogan, 2009; Garcia et al., 2018*).

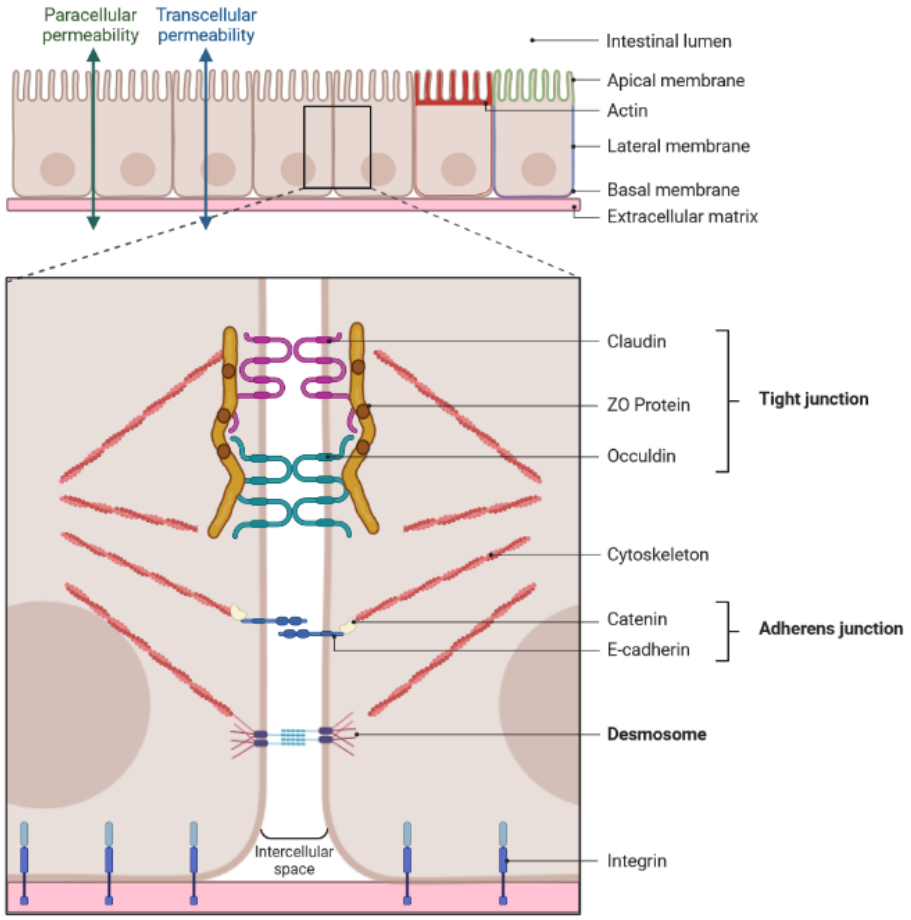


FIGURE 11 : VOIES DE PERMEABILITE CELLULAIRE ET COMPLEXES DE JONCTIONS PROTEIQUES ENTRE LES CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES

L'épithélium intestinal est constitué d'une seule couche de cellules polarisées avec des microvillosités au pôle apical formées par des filaments d'actine. La perméabilité transcellulaire correspond au mouvement de solutés à travers les cellules épithéliales intestinales. La perméabilité paracellulaire désigne le flux dans l'espace entre les cellules épithéliales. Les cellules adjacentes sont reliées par 3 complexes jonctionnels principaux : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes. Les jonctions serrées et adhérentes sont toutes deux constituées de protéines transmembranaires formant des complexes homotypiques, connectées au cytosquelette via des protéines adaptatrices. Les desmosomes forment des plaques protéiques reliés au cytosquelette. Adapté de Groschwitz and Hogan (2009).

IV.C.2. Production et rôle du mucus intestinal

L'épithélium intestinal est protégé par une **couche de mucus** dont les composants sont principalement produits par les cellules en gobelet de l'épithélium intestinal (*Johansson and Hansson, 2016; Grondin et al., 2020; Herath et al., 2020*). La couche de mucus recouvre la surface apicale de l'épithélium intestinal et constitue la première ligne de défense contre l'infiltration des micro-organismes et autres composés nocifs présents dans la lumière intestinale (*Herath et al., 2020*). Cette couche de mucus possède également un rôle dans la lubrification du contenu luminal de l'intestin et forme une niche écologique pour le microbiote intestinal (*Herath et al., 2020*).

L'organisation de la couche de mucus varie le long de l'intestin. Au niveau de **l'intestin grêle**, une seule couche de mucus discontinue et pénétrable laisse passer les nutriments et les enzymes digestives alors

que les bactéries sont tenues à l'écart par la sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth (***Figure 12A***) (*Johansson and Hansson, 2016; Herath et al., 2020*). Au niveau du **côlon,** deux couches de mucus sont présentes : une couche interne dense, non pénétrable et attachée aux cellules épithéliales, superposée d'une couche de mucus externe, plus perméable, irrégulière et moins adhérente, servant de matrice pour les bactéries du microbiote (***Figure 12B***) (*Johansson and Hansson, 2016; Grondin et al., 2020; Herath et al., 2020*). Le mucus est principalement composé de mucines qui sont des glycoprotéines constituées à 50 % de O-glycanes qui peuvent se lier à l'eau conférant ainsi les propriétés de gel à la couche de mucus (*Johansson and Hansson, 2016*).

Une vingtaine de gènes de **mucines** a été identifiée, ces gènes correspondent à deux types de mucines fonctionnelles : les mucines transmembranaires (telles que MUC1, MUC3, MUC4, MUC13 et MUC17) et les mucines sécrétées (telles que MUC2, MUC5A, MUC5B et MUC6) (*Johansson et al., 2011; Grondin et al., 2020*). Les **mucines transmembranaires** sont exprimées au niveau de la surface apicale des cellules épithéliales et forment une couche riche en glucides appelé **glycocalyx** (***Figure 12***) (*Johansson and Hansson, 2016; Grondin et al., 2020*). MUC13 est exprimé de manière constitutive dans tout l'intestin, tandis que l'expression de MUC1 est augmentée en réponse à une infection (*Johansson and Hansson, 2016*). De plus, MUC1 est plus exprimé dans les cellules en gobelet du côlon que du jéjunum (*Burclaff et al., 2022*). Les **mucines sécrétées** formant la couche de mucus sont produites et sécrétées par les cellules en gobelet. La principale mucine sécrétée au niveau de l'intestin est MUC2 (***Figure 12***). Les cellules en gobelet produisent également d'autres protéines constituant le mucus intestinal, telle que le trefoil factor 3 (**TFF3**). Ces protéines contribuent à la réparation épithéliale et consolident la couche de mucus (*Pelaseyed et al., 2014; Aihara et al., 2017*).

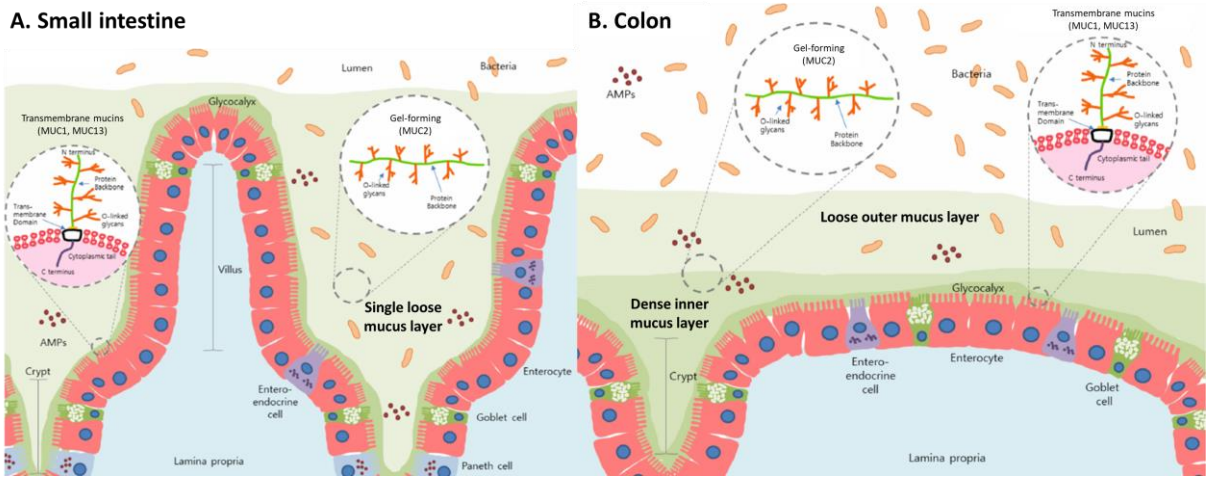


FIGURE 12 : ORGANISATION DU MUCUS DANS L'INTESTIN GRELE ET LE COLON.
Les mucines transmembranaires, notamment MUC1 et MUC13, forment une couche de glycoprotéines appelée glycocalyx et située entre les mucines sécrétées et les cellules épithéliales sous-jacentes. La principale mucine sécrétée par les cellules en gobelet est MUC2. **(A)** Dans l'intestin grêle, une seule couche de mucus faiblement attaché et pénétrable est présente. **(B)** Dans le côlon, le mucus est composé de deux couches : une couche externe perméable aux bactéries et une couche interne étroitement adhérente et peu perméable. Adapté de Grondin et al. (2020).

IV.C.3. Sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales intestinales

Les peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules épithéliales constituent une barrière chimique (*Bevins and Salzman, 2011*). Il existe divers peptides antimicrobiens tels que les défensines (*exemple* : défensine β-1, **DEFB1**), le lysozyme (**LYZ**) ou des lectines de type C (*exemple :* « Regenerating islet-derived protein 3 γ », **REG3G**), sécrétés principalement par les cellules de Paneth situées à la base des cryptes intestinales dans l'intestin grêle. Les cellules absorbantes sont également capables de sécréter certains peptides antimicrobiens tels que REG3G (*Gallo and Hooper, 2012; Peterson and Artis, 2014*). Des granules de sécrétion présentes dans les cellules de Paneth sont déversées à la base des cryptes ce qui permet de protéger les cellules souches (*Bevins and Salzman, 2011*). Les peptides antimicrobiens diffusent ensuite à travers la couche de mucus (*Bevins and Salzman, 2011*). La production de peptides antimicrobiens est fortement influencée par le microbiote et varie le long de l'intestin, notamment en lien avec la présence des cellules de Paneth uniquement dans l'intestin grêle (*Larsson et al., 2012; Peterson and Artis, 2014*). Par exemple, la protéine antimicrobienne de « resistin-like β » (RELMβ ou **RETNLB**) est produite au niveau du côlon en réponse au microbiote et permet de maintenir la ségrégation entre le microbiote et l'épithélium (*Propheter et al., 2017*). La plupart des peptides antimicrobiens tuent les micro-organismes en ciblant des éléments de la paroi bactérienne ou des membranes cellulaires (***Figure 13***) (*Gallo and Hooper, 2012*). Les peptides antimicrobiens contribuent à l'élimination des pathogènes, modulent la composition du microbiote intestinale et limitent le contact du microbiote avec les cellules épithéliales (***Figure 13***) (*Gallo and Hooper, 2012*).

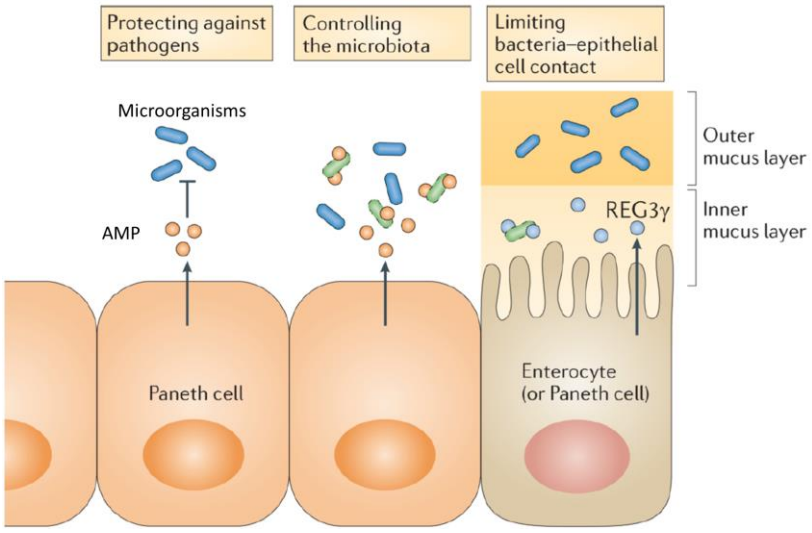


FIGURE 13 : ROLE DES PEPTIDES ANTIMICROBIENS SECRETES PAR L'EPITHELIUM INTESTINAL
Les peptides antimicrobiens (AMP) sécrétés principalement par les cellules de Paneth permettent de lutter contre les pathogènes, de moduler la composition du microbiote et de limiter les contacts entre micro-organismes et cellules épithéliales. REG3γ : Regenerating islet-derived protein 3 gamma. Adapté de Gallo and Hooper (2012).

IV.C.4. Détection de micro-organismes par l'épithélium intestinal

La détection des micro-organismes commensaux et pathogènes par les cellules épithéliales est médiée par des **récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires** (PRR, « Pattern recognition receptors ») (*Mowat and Agace, 2014; Kayisoglu et al., 2021a*). Parmi ces PRR, les « toll like-receptors » (**TLR**) et les récepteurs de type « nucleotide-binding oligomerization domain » (NOD ou « NOD-like receptors » **NLR**) jouent un rôle clé dans la reconnaissance des **motifs moléculaires associés aux pathogène** (PAMP « Pathogen associated molecular patterns ») et le déclenchement de cascades de signalisation menant au recrutement de médiateurs immunitaires (*Mowat and Agace, 2014; Kayisoglu et al., 2021a*).

Par exemple, les parois des bactéries Gram négatif sont composées de lipopolysaccharide (LPS) constituant un PAMP reconnu par le **TLR4** (*Kayisoglu et al., 2021a*). La protéine de liaison au LPS (LBP, « LPS binding protein ») transfère le LPS au **CD14** (co-récepteur du TLR4) facilitant ainsi la détection du LPS (*Richter et al., 2012*). D'autres PAMP tels que certaines lipoprotéines bactériennes ou la protéine de flagelle (flagelline) ou le composé pariétal du peptidogylcane sont reconnues par les récepteurs (PRR) **TRL2**, **TLR5** et **NOD**, respectivement (***Figure 14***). Il existe une régionalisation de l'expression des PRR le long de l'axe longitudinal de l'intestin. Par exemple, le TLR4 et son co-récepteur CD14 sont plus exprimés dans le côlon que dans l'intestin grêle chez la souris et chez l'homme (*Mowat and Agace, 2014; Kayisoglu et al., 2021a*). Cependant, il existe des différences de localisation des TLR en fonction des espèces, comme par exemple pour le TLR2 qui est plus exprimé dans l'intestin grêle que dans le côlon chez l'homme alors que l'inverse est observé pour la souris (*Kayisoglu et al., 2021a*).

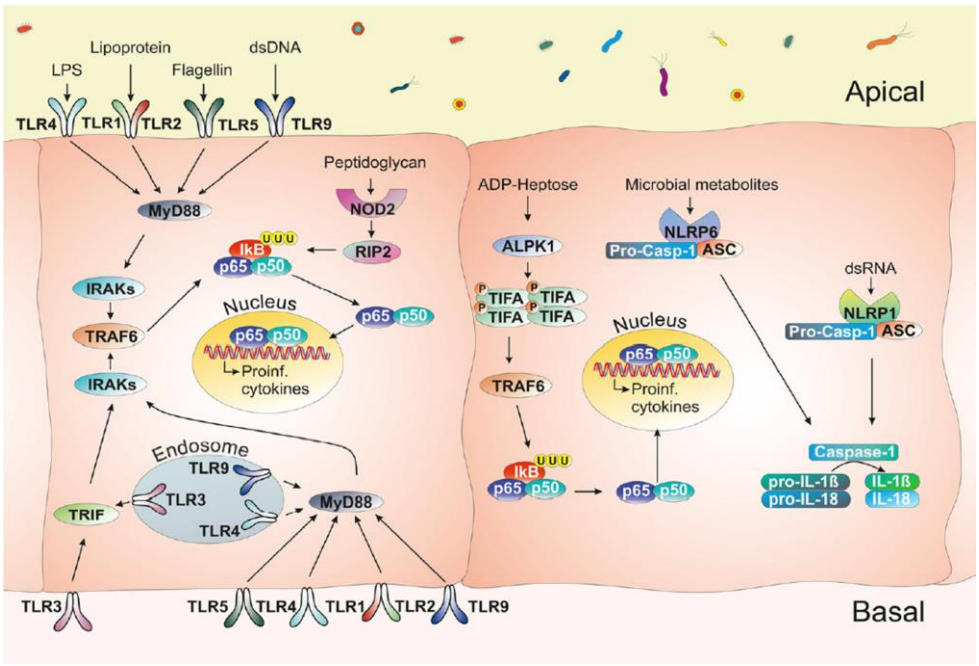


FIGURE 14 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES SYSTEMES DE DETECTION DE MOTIFS MOLECULAIRES BACTERIENS PAR LES CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES.

La reconnaissance de motifs moléculaires de micro-organismes (LPS, lipoprotéine, flagelline) par des récepteurs spécialisés (TLR, NOD, NLRP6) entraine l'activation de voie de signalisation conduisant à l'expression de cytokines pro-inflammatoires. D'après Kayisoglu et al. (2021a).

La stimulation des PRR induit l'activation de cascades de signalisation impliquant la protéine adaptatrice cytoplasmique **MyD88** dans le cas des TLR et conduisant à l'activation de facteurs de transcriptions tel que Nuclear Factor-κB (**NF-κB**) ce qui induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires (*Mowat and Agace, 2014; Kayisoglu et al., 2021a*). La voie de signalisation NF-κB comprenant notamment **NF-κB1, NF-κB2** et **RELA** entraine l'expression de gènes codant pour de nombreuses cytokines telles que **CCL20, CCL5** et **IL8** (CXCL8) (*Wang and Shen, 2022*).

L'activation des TLR participe également à la régulation de l'expression du récepteur des immunoglobulines polymériques (« polymeric immunoglobulin receptor » **PIGR**) qui joue un rôle central dans les défenses de l'intestin en sécrétant les immunoglobulines A dans la lumière (*Frantz et al., 2012*). Le PIGR exprimé au pôle basal des cellules épithéliales se lie aux immunoglobulines sécrétées par les lymphocytes B dans la *lamina propria* et les transporte à travers l'épithélium par transcytose (*Rojas and Apodaca, 2002*). Les voies de signalisation des TLR régulent également la production par les cellules épithéliales de cytokines de la superfamille des TNF (« Tumor Necrosis factor ») (**TNFSF**) 13 et 13B stimulant la production d'immunoglobulines par les lymphocytes B (*Hashiguchi et al., 2018*).

La protéine **NLRP6**, un membre de la famille NLR des capteurs cytosoliques de PAMP, joue un rôle essentiel dans la défense de l'hôte contre les infections microbiennes et dans la régulation de l'inflammation (*Venuprasad and Theiss, 2021*). Lors de la reconnaissance des PAMP, certains des NLR forment un complexe protéique multimérique appelé inflammasome permettant notamment la maturation de l'interleukine pro-inflammatoire **IL-18** (*Venuprasad and Theiss, 2021*). L'expression de NLRP6 semble fortement régionalisée dans l'intestin mais des données contradictoires ont été décrites en fonction de l'espèce étudiée (*Kayisoglu et al., 2021a*).

IV.C.5. Equilibre protéolytique de l'épithélium intestinal

L'équilibre protéolytique joue un rôle un central dans la régulation de la fonction de barrière de l'intestin et dans le dialogue avec le microbiote qui est une source importante de protéases (*Vergnolle, 2016*). Les cellules épithéliales produisent des **protéases et des inhibiteurs de protéases** tels que l'inhibiteur sécrétoire de la protéase leucocytaire (**SLPI,** « Secretory leukocyte peptidase inhibitor ») qui renforce la fonction de barrière en inhibant des protéases et les réponses inflammatoires (*Vergnolle, 2016; Nugteren and Samsom, 2021; Ozaka et al., 2021*). Un autre inhibiteur de protéases produit par l'épithélium est l'élafine (**PI3**, « peptidase inhibitor 3 »), un inhibiteur spécifique de l'élastase aux propriétés anti-inflammatoires (*Vergnolle, 2016*). Cet inhibiteur est plus exprimé au niveau de l'épithélium du côlon que de l'intestin grêle (*Nugteren and Samsom, 2021*).

L'épithélium intestinal sécrète également des protéases telles que la matriptase (**ST14**) qui est impliquée dans l'homéostasie de la barrière intestinale (*Vergnolle, 2016*). D'autres protéases comme les méprines sont capables de cliver une large gamme de peptides et cette activité est impliquée dans la sécrétion du mucus (*Bond et al., 2005; Vergnolle, 2016*). Les méprines sont des métalloprotéases composées de deux sous unités α et β (**MEP1A/B**), principalement exprimées au niveau de l'iléon et du côlon (*Bond et al., 2005*). La thrombine, codée par le gène **F2,** est une protéase exprimée par l'épithélium intestinal et induite par le microbiote (*Motta et al., 2019*). La thrombine protège l'épithélium intestinal en maintenant le microbiote à distance via l'altération de la structure des biofilms bactériens (*Motta et al., 2019*). La thrombine est issue de l'activation de la prothrombine par le complexe prothrombinase, composé d'hétérodimères des facteurs de coagulation 10a et 5a (**F10** et **F5**), également exprimés par les cellules épithéliales intestinales (*Motta et al., 2019*). Enfin, les

protéases agissent sur l'épithélium intestinal via l'activation de récepteurs spécifiques des protéases (PAR, « protease-activated receptor » codé par le gène **F2R** pour PAR1) (*Sébert et al., 2019*). L'activation de ces récepteurs dans l'intestin induit un large éventail d'effets pro-inflammatoires et prolifératifs (*Vergnolle, 2016*). La régulation de l'activité protéolytique par les cellules épithéliales intestinales semble donc jouer un rôle important dans l'homéostasie intestinale. Cependant, cette fonction n'a à notre connaissance pas été étudiée chez le porc.

IV.C.6. Equilibre d'oxydoréduction dans l'épithélium intestinal

Un des mécanismes de défense de l'épithélium intestinal consiste à produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS, « reactive oxygen species ») telles que le superoxyde (O_2^-), l'hydroxyle (OH^-) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (*Campbell and Colgan, 2019*). Ces ROS sont de puissants agents anti-microbiens. La famille des NADPH oxydases (NOX) permet la production de ROS via la réduction de l'oxygène en superoxyde (O_2^-) lors du transfert d'électrons à travers la membrane plasmique (*Bedard and Krause, 2007*). L'enzyme **NOX1** est fortement exprimée dans le côlon (*Bedard and Krause, 2007; Campbell and Colgan, 2019*). Les complexes doubles oxydases (DUOX, « dual oxydase ») permettent également de générer des ROS au niveau de l'épithélium intestinal, notamment via **DUOX2** (*Bedard and Krause, 2007; Campbell and Colgan, 2019*). Il existe des facteurs de maturation des DUOX (**DUOXA2**) permettant de limiter la rétention de DUOX dans le réticulum endoplasmique (*Bedard and Krause, 2007*). Bien que les ROS jouent un rôle antibactérien important, leur production excessive peut causer des dommages aux cellules de l'hôte (**stress oxydant**) (*Campbell and Colgan, 2019*). Des enzymes spécialisées sont impliquées dans la détoxification des ROS. Par exemple, les superoxyde dismutases (**SOD**), convertissent les radicaux oxygène en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (*Campbell and Colgan, 2019*). L'H_2O_2 peut ensuite être réduit par d'autres enzymes antioxydantes telles que les glutathionne peroxydase (**GPX**) permettant de convertir le glutathion en glutathion oxydé (*Campbell and Colgan, 2019; Sharifi-Rad et al., 2020*). D'autres enzymes jouent un rôle important dans l'équilibre redox de l'épithélium intestinal, telles que la prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (**PTGS2**) permettant la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines 2 (PGE2) (*Campbell and Colgan, 2019*). Globalement, l'équilibre entre les défenses pro-oxydantes et les mécanismes antioxydants sont nécessaire pour garantir l'homéostasie de l'épithélium intestinal.

En résumé

Les cellules épithéliales sont formées d'une monocouche de cellules polarisées et jointives entre elles grâce à un réseaux complexe de protéines de jonctions. Cette organisation est associée à la mise en place d'une perméabilité sélective permettant d'assurer les fonctions de sécrétion, d'absorption et de barrière contre les composés luminaux indésirables. La diversité fonctionnelle de l'épithélium repose sur la spécialisation des cellules différenciées absorbantes et sécrétrices. Les cellules absorbantes participent à la digestion, à l'absorption de nutriments et au contrôle des flux d'ions et d'eau. Les cellules entéroendocrines régulent la prise alimentaire et le métabolisme en sécrétant des hormones. Les cellules en gobelet et les cellules de Paneth protègent l'épithélium en sécrétant du mucus et des peptides antimicrobiens. Les cellules épithéliales intestinales contribuent également aux défenses immunitaires innées de l'intestin en détectant la présence de micro-organismes et en y répondant notamment par la sécrétion de cytokines et l'activation d'enzymes pro-oxydantes ou protéolytiques. L'ensemble de ces fonctions épithéliales sont fortement régionalisées, en lien avec la spécialisation de l'intestin grêle pour la digestion et l'absorption des nutriments et du côlon pour le contrôle des flux d'ions et d'eau ainsi que pour contenir le microbiote.

V. Colonisation de l'intestin par le microbiote et conséquences pour l'épithélium

L'intestin est colonisé par une vaste communauté de micro-organismes formant le microbiote intestinal. Le développement de cet écosystème intestinal est initié à la naissance avec la colonisation par des micro-organismes provenant de la mère et de l'environnement (*Frese et al., 2015; Mach et al., 2015; Zhang et al., 2016; Choudhury et al., 2021; Tang et al., 2022b*). C'est un écosystème dynamique dont la composition et la diversité évoluent au cours du temps et le long du tractus gastro-intestinal (*Lallès et al., 2007b; Gresse et al., 2017; Holman et al., 2017; Tang et al., 2022b*). Le microbiote évolue rapidement au début de la vie et notamment lors du sevrage (*détaillé dans le Chapitre 2, partie II.E*). Tout le tractus digestif est colonisé par des micro-organismes mais le côlon est le segment dont la densité et la diversité bactérienne est la plus élevée (*Heo et al., 2013; Zhang et al., 2016; Kelly et al., 2017; Zheng et al., 2021*). Il existe d'importantes différences de microbiote en fonction de la localisation longitudinale dans l'intestin mais aussi en fonction de la distance à la muqueuse intestinale (*Donaldson et al., 2016; Holman et al., 2017*). La spécificité du microbiote en fonction de la localisation dans l'intestin est liée à des différences de caractéristiques environnementales (concentration en oxygène, pH, temps de transit), de mécanismes de défenses de l'hôte (*exemple :* peptides antimicrobiens) et de disponibilités des substrats issus de l'alimentation (*exemple :* glucides simples versus glucides complexe) ou des sécrétions de l'hôte (*exemple :* mucines) (*Donaldson et al., 2016*).

Chez le porc, comme chez l'homme, les phyla majoritaires du microbiote intestinal sont les *Firmicutes,* les *Bacteroidota* (anciennement *Bacteroidetes*) et les *Proteobacteria* (*Holman et al., 2017; Kelly et al., 2017*). L'abondance des *Proteobacteria* est élevée dans le duodénum et le jéjunum et diminue le long du tractus digestif. La répartition de ce phylum incluant de nombreuses bactéries aérobies facultatives s'explique notamment par le gradient décroissant d'oxygène le long du tractus digestif. Au contraire, l'abondance des *Bacteroidota* augmente le long du tractus digestif (***Figure 15***) (*Kelly et al., 2017*). Ce profil de colonisation peut s'expliquer par la spécialisation de certaines bactéries de ce phylum à dégrader les fibres alimentaires (*exemple : Prevotella*). Dans le phylum des *Firmicutes*, les *Lactobacillus* dominent le microbiote de l'intestin grêle alors qu'ils sont nettement moins abondants dans le gros intestin (*Holman et al., 2017*).

Le microbiote intestinal agit sur l'épithélium intestinal par divers mécanismes incluant notamment des motifs moléculaires (*exemple :* composés pariétaux, MAMP) reconnus par des récepteurs spécialisés (PRR) (*Peterson and Artis, 2014*). Par ailleurs, l'activité métabolique du microbiote intestinal entraine la libération dans la lumière intestinale de nombreux **métabolites** (molécules de faible poids moléculaire) pouvant agir directement sur les cellules épithéliales (*Koh et al., 2016*). Parmi ces métabolites bactériens, les acides gras à chaîne courte (AGCC) (acétate, propionate et butyrate) sont majoritairement issus de l'activité de fermentation des glucides par le microbiote (*Guilloteau et al., 2010; Koh et al., 2016*). Ceux-ci ont globalement des effets protecteurs sur la barrière intestinale et stimulent le système immunitaire.

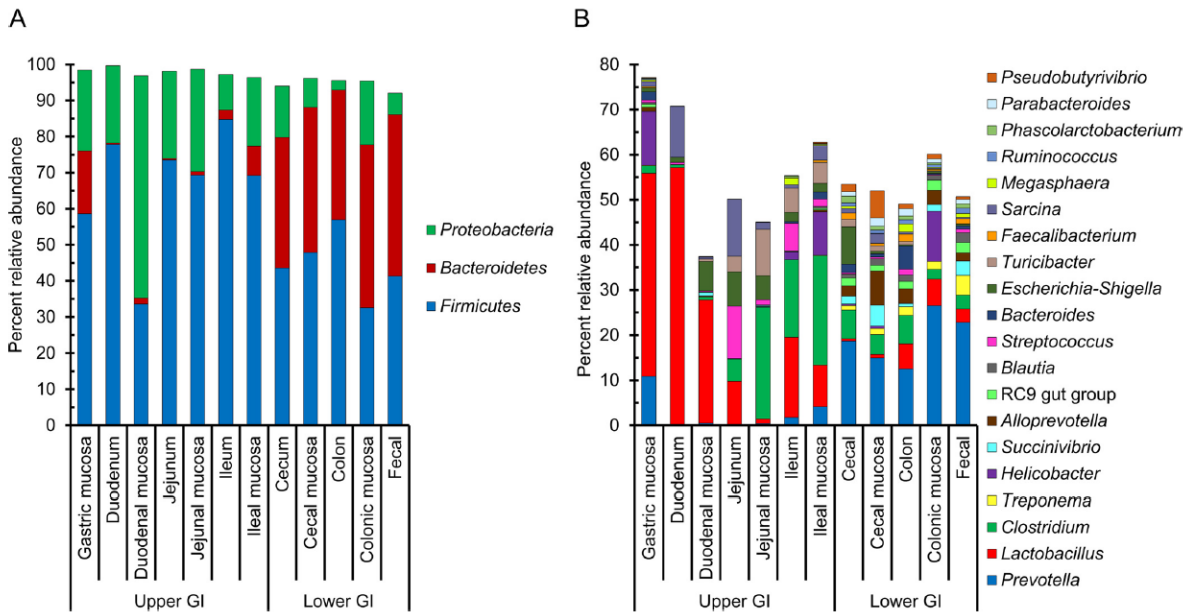


FIGURE 15 : COMPOSITION DU MICROBIOTE INTESTINAL DU PORC EN FONCTION DES SEGMENTS INTESTINAUX
Abondance relative des principaux phyla **(A)** et genres **(B)** bactériens le long du tractus gastro-intestinal du porc. GI : gastrointestinal tract. D'après Holman et al. (2017).

Le **butyrate** est un des métabolites dont les effets sur l'épithélium sont les mieux caractérisés et il a été étudié dans le cadre de cette thèse. Il constitue une source importante d'énergie pour les cellules épithéliales intestinales matures du côlon qui l'oxydent par la β-oxydation (***Figure 16***) (*Guilloteau et al., 2010*), contrairement aux entérocytes de l'intestin grêle qui utilisent principalement le glucose ou la glutamine comme source d'énergie (*Salvi and Cowles, 2021*). Le butyrate favorise la différenciation épithéliale et réduit la prolifération des cellules souches via son rôle d'inhibiteur des histones désacétylases (HDAC) (***Figure 16***) (*Davie, 2003; Guilloteau et al., 2010*). De nombreuses études ont montré des effets différents du butyrate selon le niveau de différenciation des cellules (*Salvi and Cowles, 2021*). Ce phénomène, appelé **paradoxe du butyrate**, s'expliquerait par une utilisation différente du butyrate par les cellules différenciées ou prolifératives. Dans les cellules différenciées, le butyrate serait rapidement métabolisé pour fournir de l'énergie aux cellules, alors que les cellules prolifératives utiliseraient préférentiellement le glucose comme source d'énergie ce qui permettrait au butyrate de s'accumuler et d'exercer son action d'inhibiteur des HDAC bloquant ainsi la progression du cycle cellulaire (*Salvi and Cowles, 2021*). Les cellules prolifératives situées au fond des cryptes intestinales sont donc menacées par le butyrate mais elles sont protégées par l'architecture de la crypte. En effet, le butyrate est rapidement absorbé et oxydé par les colonocytes matures situés au sommet des cryptes, créant un gradient de concentration du butyrate le long de l'axe crypte-villosité (***Figure 16***) (*Kaiko et al., 2016; Salvi and Cowles, 2021*).

Par ailleurs, le butyrate peut agir directement sur les cellules épithéliales via des récepteurs couplés aux protéines G (GPR41 et GPR43) permettant de moduler l'inflammation intestinale (***Figure 16***) (*Salvi and Cowles, 2021; van der Hee and Wells, 2021*). De nombreuses études menées *in vivo* et sur des lignées cellulaires épithéliales intestinales humaines et porcines ont montré que le butyrate renforce la fonction de barrière de l'épithélium en association avec la régulation de l'expression de protéines de jonctions serrées et de la production de nombreuses cytokines, peptides antimicrobiens, mucines et entérohormones (*Peng et al., 2007; Koh et al., 2016; Yan and Ajuwon, 2017; van der Hee and Wells, 2021*).

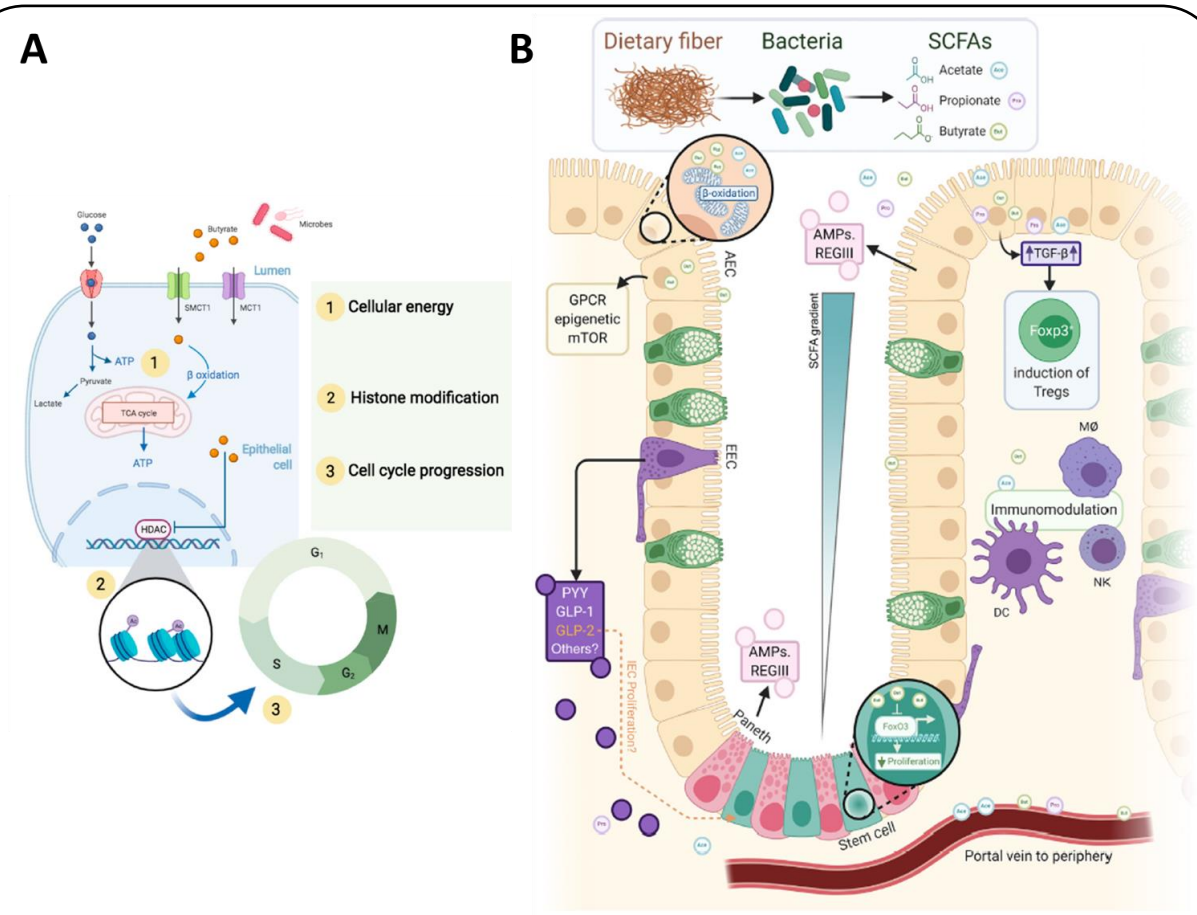


FIGURE 16 : MECANISMES D'ACTION ET EFFETS DU BUTYRATE SUR L'EPITHELIUM INTESTINAL

(A) Le butyrate est transporté par des transporteurs (MCT1/SMCT1) à l'intérieur des cellules. 1/ Le butyrate peut être rapidement oxydé et utilisé pour la production d'énergie. 2/ Le butyrate est un inhibiteur d'HDAC et régule ainsi l'expression de gènes. 3/ Plus précisément, ces modifications épigénétiques au niveau des histones induites par le butyrate sont associées à l'activation transcriptionnelle de gènes impliqués dans l'inhibition du cycle cellulaire. **(B)** Le devenir du butyrate cytoplasmique dépend de l'état de différenciation de la cellule, ce qui explique le « paradoxe du butyrate ». En effet, le butyrate peut être utilisé comme source d'énergie par les entérocytes matures via la β-oxydation contrairement aux cellules en prolifération qui favorisent l'utilisation de glucose. L'architecture de la crypte pourrait permettre aux cellules matures de protéger les cellules souches en oxydant le butyrate et en créant ainsi un gradient décroissant de concentration de ce métabolite. Le butyrate induit également l'expression de peptides antimicrobiens (AMP) et de cytokines par les entérocytes, notamment via des récepteurs couplés aux protéines G (GPR41 et GPR43). Dans les cellules entéroendocrines, le butyrate induit la libération d'hormones (PYY, GLP1) régulatrices de l'appétit et du métabolisme. Adapté de Salvi and Cowles (2021) et de van der Hee and Wells (2021).

Chapitre 2 : Le sevrage, une période critique pour la santé digestive chez le porcelet

Chez les mammifères, le **sevrage** correspond à l'arrêt de l'ingestion de lait (hautement digestible) et au passage à une alimentation exclusivement solide (plus complexe et moins digestible). Cette période est la plus critique dans la vie du porcelet en condition d'élevage (*Lallès et al., 2007a; Gresse et al., 2017*).

I. Le sevrage des porcelets

I.A. Sevrage en condition naturelle et en élevage conventionnel

En **condition naturelle**, le sevrage des porcelets a lieu entre 10 et 12 semaines d'âge et le démarrage de l'ingestion d'aliments solides est progressif (*Moeser et al., 2017*). En **élevage commercial conventionnel**, pour des raisons économiques liées aux cycles de reproduction, le sevrage des porcelets a lieu précocement, généralement entre 3 et 5 semaines d'âge (entre 21 et 35 jours) (*Le Dividich and Sève, 2000; Lallès et al., 2007a; Moeser et al., 2017*). Un aliment solide est classiquement disponible pour le porcelet allaité (appelé « creep feed ») mais à cet âge l'ingestion spontanée d'aliments solides est très faible (*Le Dividich and Sève, 2000; Middelkoop et al., 2019*). Néanmois, une ingestion significative d'aliment solide par le porcelet peut être observé dès 15 jours d'âge (*Choudhury et al., 2021*). Dans les élevages sous cahier des charges Agriculture Biologique, le sevrage des porcelets est réalisé après 40 jours minimum d'allaitement.

En élevage conventionnel, la **transition du lait maternel à l'alimentation exclusivement solide** est donc brusque, entrainant une période critique de sous-alimentation (**anorexie post-sevrage**) pendant laquelle les porcelets doivent s'adapter à leur nouvelle alimentation (*Le Dividich and Sève, 2000; Lallès et al., 2004*). Cette **période de jeûne post-sevrage** dure généralement de 24 à 48 heures (*Heo et al., 2013; Gresse et al., 2017*). Le sevrage est également associé à de nombreux **changements psychosociaux et environnementaux**, tels que la séparation de la mère et des congénères de portée, la manipulation par l'éleveur, le transport, un changement d'hébergement, le mélange avec d'autres congénères non familiers et l'établissement d'une nouvelle hiérarchie sociale. Tous ces changements constituent une importante **période de stress** pour les porcelets (Le Dividich and Sève, 2000; Moeser et al., 2007a; Gresse et al., 2017; Moeser et al., 2017).

La pratique en élevage du sevrage précoce ne correspond pas à la **cinétique de maturation de l'intestin** (morphologie, nutrition, immunité) chez le porcelet qui se déroule jusqu'à 3 mois après la naissance (*Moeser et al., 2017*). Contrairement aux **conditions naturelles** où le sevrage s'opère lorsque l'intestin est proche de la maturité, le sevrage précoce du porcelet en **conditions commerciales conventionnelles** a lieu alors que l'intestin est encore fortement immature. Le sevrage précoce est donc considéré comme un perturbateur des processus de développement normaux du tractus intestinal pouvant avoir un impact durable sur la santé et le bien-être des porcelets (*Choudhury et al., 2021*). La conséquence la plus importante du sevrage précoce est l'apparition de troubles digestifs fréquemment observés en élevage.

I.B. Troubles digestifs post-sevrage chez le porcelet

Des **diarrhées** sont couramment observées chez le porcelet au cours des premières semaines suivant le sevrage (*Madec et al., 1998*). Ceux-ci constituent un problème majeur dans l'industrie porcine en raison d'un ralentissement de la croissance et d'une augmentation de la mortalité entrainant des pertes économiques majeures (*Moeser and Blikslager, 2007*). Ces troubles digestifs survenant après le sevrage impactent également négativement le bien-être animal (*Lallès et al., 2007a; Moeser and Blikslager, 2007*). Les **antibiotiques** sont couramment utilisés pour prévenir l'apparition de ces troubles digestifs, contribuant à l'émergence de pathogènes résistants aux antibiotiques. Cette résistance aux antibiotiques des micro-organismes constitue un problème majeur en santé publique humaine et animale (*Tompson et al., 2021*) (*détaillé dans la partie III*).

Les troubles digestifs observées après le sevrage chez le porcelet sont souvent dus à l'infection par un ou plusieurs agents pathogènes. En effet, la **sensibilité aux infections entériques** est accrue durant la période post-sevrage (*Lallès et al., 2007a*). Bien que les *Escherichia coli (E. coli)* soient des bactéries commensales du tube digestif, certaines souches peuvent être pathogènes et impliquées dans les diarrhées post-sevrage des porcelets (*Heo et al., 2013*). Les ***E. coli* entérotoxigénique (ETEC)** sont les principaux agents infectieux de la diarrhée post-sevrage chez les porcelets (*Nagy and Fekete, 2005; Gresse et al., 2017*). La prolifération d'ETEC dans le tube digestif a pour effet d'augmenter la sécrétion d'électrolytes et de réduire l'absorption ionique au niveau des cellules épithéliales, créant une surcharge osmotique, ce qui contribue directement à une déshydratation et à l'apparition de diarrhée (*Nagy and Fekete, 2005; Moeser and Blikslager, 2007*). Les infections par ***Salmonella Typhimurium*** peuvent également causer d'importantes diarrhées dues à une forte inflammation intestinale (*Moeser and Blikslager, 2007*). Les diarrhées post-sevrage peuvent aussi apparaitre suite à des **infections virales,** notamment par des rotavirus ou des coronavirus (*Moeser and Blikslager, 2007*). Globalement, les infections entériques post-sevrage entrainent des altérations des fonctions d'absorption et de sécrétion, mais aussi une altération de la fonction barrière intestinale, conduisant à une activation des cascades d'inflammation intensifiant les diarrhées (*Moeser and Blikslager, 2007*).

Bien que les infections jouent un rôle central dans les diarrhées post-sevrage des porcelets, ces troubles digestifs sont **multifactoriels.** En particuliers, les **facteurs alimentaires** sont directement impliqués dans le développement des diarrhées. Chez les porcelets sevrés précocement, des diarrhées osmotiques non infectieuses peuvent être causées par l'accumulation de glucides non absorbés en raison de la capacité digestive limitée de l'intestin encore immature (*Hampson and Kidder, 1986*). De plus, l'arrêt de l'allaitement stoppe l'immunité passive qui apporte des facteurs immunitaires protecteurs, tels que les immunoglobulines (*Curtis and Bourne, 1971; Klobasa et al., 1987*), essentiels à la protection du porcelet contre les infections (*Lallès et al., 2007a*). Le système immunitaire de l'intestin étant encore immature lors de la période de sevrage, les porcelets sont dépendants de l'apport de ces facteurs immunitaires issus du lait. L'anorexie post-sevrage induite par le changement brusque d'alimentation prédispose également les porcelets aux infections entériques en fragilisant la barrière intestinale (*McCracken et al., 1999*). Enfin, lors du sevrage, les changements alimentaires entrainent également une modification du microbiote intestinal qui pourrait contribuer au développement de diarrhées (*détaillé dans la partie II.E*).

Par ailleurs, l'alimentation solide introduite lors du sevrage principalement à base de céréales peut être contaminée, lorsque les conditions de stockage ne sont pas optimales, par des métabolites secondaires toxiques produits par des champignons (**mycotoxines**) (*Pierron et al., 2016*). Parmi ces molécules, le **déoxynivalénol (DON)** est une mycotoxine produite par des champignons du genre

Fusarium. La consommation d'aliments contaminés par le DON par les porcelets diminue leur prise alimentaire, entraine des lésions intestinales telles qu'une atrophie villositaire, altère la fonction d'absorption et de barrière de l'épithélium intestinal, induit une inflammation intestinale et pourrait modifier le microbiote (*Ghareeb et al., 2015; Pierron et al., 2016; Zheng et al., 2021*). Au niveau moléculaire, le DON inhibe la synthèse protéique via son interaction avec les ribosomes (*Akbari et al., 2017*). De nombreuses études menées sur des lignées de cellules épithéliales intestinales humaines (Caco-2, T84 et HT29) et porcines (IPEC-1 et IPECJ2) ont montré que le DON réduit la fonction de barrière de l'épithélium, en lien avec une altération majeure de l'expression des protéines de jonctions serrées (*Akbari et al., 2017*). La sensibilité intestinale au DON étant particulièrement importante chez les jeunes animaux (*Pierron et al., 2016*), les effets toxiques du DON pourraient être exacerbés chez les porcelets sevrés précocement et le DON pourrait ainsi contribuer aux troubles digestifs post-sevrage.

Enfin, d'autres facteurs environnementaux tels que la température et les modifications psychosociales jouent également un rôle essentiel dans l'apparition des diarrhées post-sevrage, notamment via un affaiblissement de la barrière épithéliale (Moeser et al., 2007a; Moeser and Blikslager, 2007; Gresse et al., 2017). Par exemple, la diminution de la température ambiante classiquement observée après le sevrage augmente la gravité des diarrhées post-sevrage liées à une infection virale (*Shimizu et al., 1978*). L''hygiène des bâtiments d'élevage peut également être à l'origine des diarrhées post-sevrage (*Le Floc'h et al., 2014*).

En résumé

Le sevrage des porcelets en conditions commerciales conventionnelles intervient alors que l'intestin est encore immature, favorisant l'apparition de diarrhées au cours des premières semaines suivant le sevrage. Ces troubles digestifs observés sont multifactoriels et impliquent des infections entériques ainsi que d'importantes modifications environnementales, notamment alimentaires. L'ensemble de ces facteurs entraine une altération de l'homéostasie intestinale conduisant à l'apparition de diarrhées. La compréhension des mécanismes impliqués dans la perturbation de l'homéostasie intestinale lors du sevrage des porcelets apparait donc essentielle pour mettre en place des stratégies préventives des diarrhées post-sevrage.

II. Adaptations intestinales lors du sevrage chez le porcelet

II.A. Modification de la morphologie de l'épithélium intestinal lors du sevrage des porcelets

En élevage conventionnel, le sevrage induit des changements importants dans la morphologie de la muqueuse intestinale chez le porcelet. En effet, **l'intestin** perd 20 à 30 % de son poids dans les premiers jours suivant le sevrage (*Lallès et al., 2004*). Après le sevrage, la hauteur des villosités est réduite (**atrophie villositaire**) au niveau de l'intestin grêle (***Tableau 1***) (*Spreeuwenberg et al., 2001; Boudry et al., 2004; Lallès et al., 2004; Pié et al., 2004; Moeser et al., 2007a; Wijtten et al., 2011; Hu et al., 2013*). Une augmentation de la profondeur des cryptes (**hyperplasie des cryptes**) est également rapportée dans plusieurs études (*Boudry et al., 2004; Moeser et al., 2007a; Heo et al., 2013*) (***Tableau 1***). Le ratio villosité/crypte ainsi diminué reflète une réduction de la capacité de digestion et d'absorption de

nutriments par l'intestin (*Le Dividich and Sève, 2000; Tang et al., 2022b*), contribuant ainsi à l'apparition de diarrhées osmotiques liées à l'accumulation de nutriments (glucides principalement) non absorbés dans le côlon (*Lallès et al., 2004*). Les modifications de la morphologie de l'épithélium intestinal lors du sevrage seraient principalement liées au faible niveau d'ingestion d'aliment (*Spreeuwenberg et al., 2001; Boudry et al., 2002*). De plus, les différents stress rencontrés au cours du sevrage (*présentés dans la partie I.A*) et la diminution de l'apport alimentaire perturbent l'équilibre entre la prolifération cellulaire au niveau des cryptes et l'exfoliation (apoptose) des cellules épithéliales au sommet des villosités, modifiant l'architecture de l'épithélium intestinal (*McCracken et al., 1999; Boudry et al., 2004; Montagne et al., 2007; Tang et al., 2022b*). Ces changements dans la morphologie de l'épithélium intestinal à une étape clé du développement de l'intestin grêle participent à la rupture de l'homéostasie.

TABLEAU 1 : TAILLE DES VILLOSITES ET DES CRYPTES DANS L'INTESTIN GRELE DE PORCELETS APRES LE SEVRAGE (21 JOURS)

		Day post-weaning						
Variable	Site	0	2	5	8	15	SEM	Significance
Intestinal morphometry (μm)								
Villus length	Proximal jejunum	597[a]	356[c]	359[c]	377[c]	457[b]	27	<0·0001
	Distal ileum	340	295	268	329	317	20	0·128
Crypt depth	Proximal jejunum	216[c]	211[c]	367[a]	304[b]	308[b]	13	<0·0001
	Distal ileum	156[c]	146[c]	194[b]	204[b]	240[a]	10	<0·0001

D'après Montagne et al. (2007)

II.B. Adaptation de la fonction de nutrition de l'épithélium lors du sevrage des porcelets

Dans la semaine qui suit le sevrage, le temps de **transit des aliments** est prolongé le long du tractus intestinal. Ceci s'explique par une modification de la motilité intestinale liée aux stress sociaux, environnementaux et nutritionnels (*Snoeck et al., 2004*). La modification de l'architecture de la muqueuse décrite précédemment est associée à des changements d'activité des enzymes digestives de la bordure en brosse de l'épithélium intestinal, modifiant les fonctions de digestion, d'absorption des nutriments et de l'eau ainsi que des sécrétions ioniques (*Snoeck et al., 2004; Wijtten et al., 2011*).

Autour de la période de sevrage, les **activités des enzymes digestives** au niveau de la bordure en brosse des cellules épithéliales évoluent naturellement avec l'âge principalement au niveau du jéjunum et correspond à l'adaptation de l'épithélium intestinal au passage de l'ingestion de lait maternel à l'alimentation solide à base de végétaux (***Figure 17***) *(Boudry et al., 2002, 2004; Lallès et al., 2004; Pié et al., 2004; Heo et al., 2013*). Lors de la transition alimentaire du sevrage, l'activité **lactase** permettant la dégradation du lactose (glucide du lait) diminue avec la même amplitude que l'évolution lié à l'âge, alors qu'il y a une augmentation des activités **sucrase isomaltase** et **maltase,** dégradant les disaccharides (***Figure 17***) (*Boudry et al., 2002, 2004; Lallès et al., 2004; Pié et al., 2004; Marion et al., 2005; Montagne et al., 2007; Heo et al., 2013*). Ces changements sont induits par les modifications alimentaires mais aussi par des facteurs ontogéniques (liés à l'âge) (*Marion et al., 2005*). L'activité enzymatique de la **dipeptidyl-peptidase IV**, impliquée dans la dégradation des oligopeptides en acides aminées (*Do et al., 2014*) est augmentée après le sevrage (***Figure 17***) (*Boudry et al., 2002; Marion et al., 2005*). L'activité enzymatique de l'**alcaline phosphatase intestinale**, impliquée dans l'absorption

intestinale des lipides (*Lallès, 2010*), est également augmentée après l'ingestion d'aliment solide chez le porc et le rat (*Boudry et al., 2002; Estaki et al., 2014*).

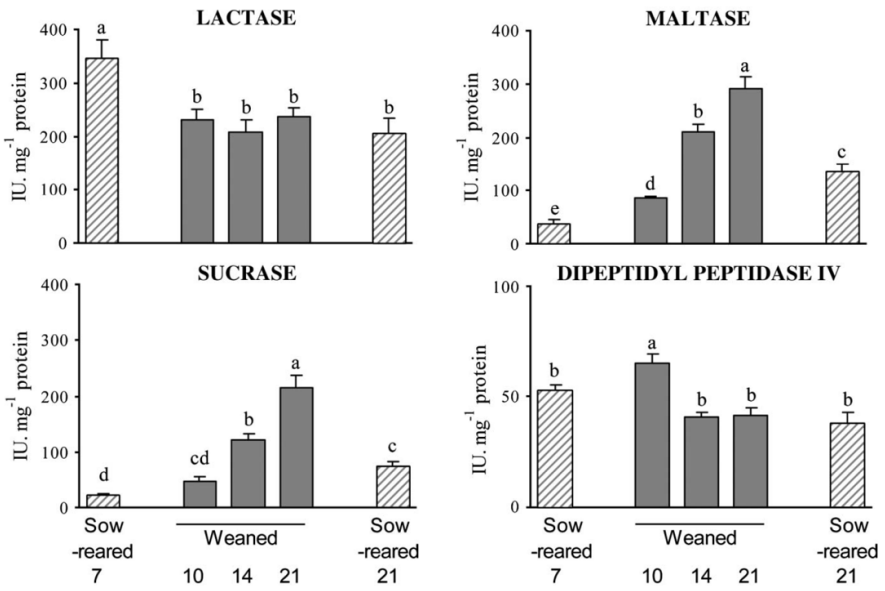


FIGURE 17 : ACTIVITE ENZYMATIQUES LACTASE, SUCRASE, MALTASE ET DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV DANS LE JEJUNUM DE PORCELETS LORS DU SEVRAGE

L'activité des enzymes lactase, sucrase, maltase et dipeptidyl peptidase IV a été analysé dans le jéjunum de porcelets allaités jusqu'à l'âge de 7 ou 21 jours (Sow-reared 7 et Sow-reared 21, respectivement). Parallèlement, des porcelets ont été sevrés à l'âge de 7 jours puis euthanasiés pour l'analyse de l'activité enzymatique à 3 (10 jours d'âge), 7 (14 jours d'âge) ou 14 jours (21 jours d'âge) post-sevrage (Weaned). Les résultats montrent à la fois des effets du sevrage et des effets de l'âge, indépendamment de l'alimentation. Adapté de Marion et al. (2005).

D'autres études ont caractérisé **l'expression des gènes de ces enzymes digestives** dans l'épithélium autour du sevrage. Mohammad et al. (2020) ont montré chez le porcelet entre 7 jours et 35 jours d'âge (avec un sevrage à 21 jours) une augmentation de l'expression des gènes de la **sucrase isomaltase** (SI) et de l'**arginase 2** (ARG2), permettant le catabolisme de l'arginine abondamment présente dans les aliments solides (*Navis et al., 2019*). Au contraire, une diminution de l'expression du gène de la lactase (LCT) est observée pendant cette période. Dans d'autres études, l'expression du gène de la lactase n'est pas diminuée après le sevrage, contrairement à l'activité enzymatique, suggérant que le jeûne post-sevrage affecte le processus post-transcriptionnel par un manque d'acides aminés disponibles (*Marion et al., 2005; Montagne et al., 2007*). Peu d'études ont caractérisé les effets du sevrage sur l'expression de gènes codant pour les entérohormonnes. Des résultats contradictoires ont montré une augmentation ou une diminution de l'expression du gène de la **cholécystokinine** (CCK), impliquée dans la régulation de la satiété et la motilité intestinale (*Zhu et al., 2014; Saladrigas-García et al., 2021*)..

L'**absorption passive** des nutriments est diminuée après le sevrage mais ne semble pas être affecté par l'âge lors du sevrage, ni par la faible ingestion d'aliment au début de la période post-sevrage (*Hampson and Kidder, 1986; Wijtten et al., 2011*). Cette réduction de l'absorption passive transcellulaire après le sevrage serait un mécanisme de défense empêchant le transport non contrôlé d'agents pathogènes vers l'organisme (*Wijtten et al., 2011*). L'**absorption active** des nutriments diminue également après le sevrage lorsque les animaux sont sevrés entre 14 et 23 jours mais pas

lorsque les porcs sont sevrés après 28 jours (*Wijtten et al., 2011*). Boudry et al. (2004) ont décrit une augmentation transitoire de l'absorption du glucose jusqu'à 2 jours post-sevrage dans le jéjunum suivie d'une diminution jusqu'à 15 jours après le sevrage (***Figure 18***). La faible consommation d'aliments après le sevrage pourrait expliquer cette stimulation compensatoire de l'absorption du glucose à court terme (*Boudry et al., 2004; Wijtten et al., 2011*).

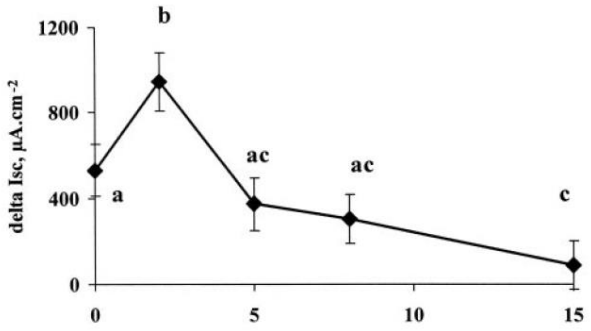


FIGURE 18 : MODIFICATION DE L'ABSORPTION DU GLUCOSE Na^+ DEPENDANTE DANS LE JEJUNUM DE PORCELETS APRES LE SEVRAGE

Des porcelets ont été sevrés à l'âge de 21 jours, suivi d'une période de privation de nourriture de 48 heures après le sevrage. Les porcelets ont été euthanasiés à différents temps post-sevrage (0, 2, 5, 8 et 15 jours) et les tissus de jéjunum ont été collectés pour la mesure de l'absorption du glucose dépendant du Na^+ à l'aide de chambres de Ussing. L'absorption du glucose a été évaluée par l'augmentation du courant de court-circuit (Isc) après l'ajout de 16 mM de D-glucose équilibré osmotiquement du côté séreux par 16 mmol/L de mannitol. L'absorption du glucose dépendant de Na^+ était significativement augmentée 2 jours post-sevrage. Cette augmentation était transitoire, car l'absorption du glucose était revenue aux valeurs d'avant sevrage à 5 jours post-sevrage, continuant à diminuer jusqu'à atteindre un niveau plus bas 15 jours post-sevrage. Les points sans lettre commune diffèrent avec $p < 0,05$. D'après Boudry et al. (2004).

Une augmentation de l'**activité sécrétoire d'électrolytes** par l'épithélium est observée après le sevrage au niveau de l'intestin grêle principalement (***Figure 19***) (*Boudry et al., 2004; Moeser et al., 2007a*). Cette augmentation de l'activité sécrétoire est souvent associée à l'infection par des pathogènes entériques, et notamment les ETEC, connues pour stimuler la sécrétion épithéliale par la production d'entérotoxines agissant sur le « cystic fibrosis transmembrane conductance regulator » (**CFTR**) impliqué dans la sécrétion des ions Cl^- et HCO_3^- (*Lallès et al., 2004; Moeser and Blikslager, 2007; Heo et al., 2013*). L'hyper-sécrétion d'eau et d'électrolytes au niveau de l'intestin grêle, associée à une faible capacité de réabsorption dans l'iléon, entraine une accumulation d'eau dans le côlon dépassant sa capacité d'absorption d'eau, ce qui entraine une diarrhée osmotique et une déshydratation (*Boudry et al., 2004; Heo et al., 2013*).

La modification des fonctions de sécrétion et d'absorption en réponse au sevrage sont différentes en fonction des segments, avec les effets les plus marqués dans la partie proximale de l'intestin grêle (*Boudry et al., 2004; Heo et al., 2013*). La diminution de l'absorption (passive et active) pourrait refléter un processus naturel de maturation de l'intestin renforcé par le sevrage (*Wijtten et al., 2011*). Le passage d'ions et de petites molécules peut également se faire par le transport paracellulaire (entre les cellules). Le contrôle de cette perméabilité par les protéines de jonctions serrée est important pour le maintien de la fonction de barrière de l'épithélium intestinal qui est également affectée par le sevrage précoce chez les porcelets.

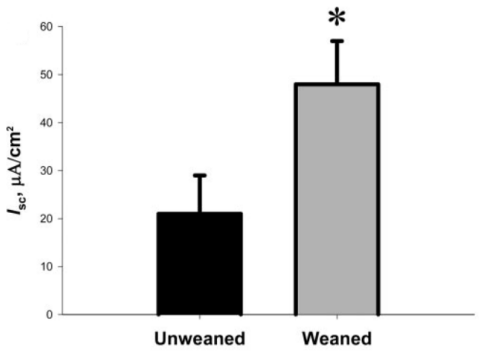


FIGURE 19 : IMPACT DU SEVRAGE SUR LE TRANSPORT D'IONS DANS L'INTESTIN DES PORCELETS

A l'âge de 19 jours, des porcelets ont été sevrés (Weaned) ou ont continués l'allaitement (porcelets allaités témoins, Unweaned). Les tissus du jéjunum ont été collectés à 24 heures après l'âge du sevrage chez les porcs sevrés et allaités pour la mesure du flux d'ions à l'aide de chambre de Ussing. Le sevrage a stimulé l'augmentation du flux Isc (courant de court-circuit) dans le jéjunum, indiquant une augmentation de la sécrétion d'ions. * : $p < 0,05$ par rapport aux porcelets témoins non sevrés. Les mêmes résultats ont été obtenu à partir de tissu de côlon. D'après Moeser et al. (2007a).

II.C. Adaptation de la fonction barrière de l'épithélium intestinal lors du sevrage des porcelets

L'impact du sevrage sur l'intégrité de la **fonction barrière de l'épithélium intestinal** peut être caractérisé par mesure de la perméabilité paracellulaire. De nombreuses études sur des modèles *ex vivo* de l'épithélium intestinal, ont montré que le sevrage précoce (généralement autour de 21 jours) induisait une diminution de la résistance électrique transépithéliale (TEER) et une augmentation du flux de molécules de faible poids moléculaire (*exemple :* mannitol), indiquant une augmentation de la perméabilité paracellulaire (*Spreeuwenberg et al., 2001; Boudry et al., 2004; Moeser et al., 2007a; Hu et al., 2013; Cao et al., 2018*) (***Figure 20***). L'augmentation de la perméabilité est souvent observée dans la première semaine post-sevrage (*Wijtten et al., 2011*). Néanmoins, cette dysfonction de la barrière intestinale n'est pas observée lorsque le sevrage est plus tardif (à 28 jours) (***Figure 21***) (*Moeser et al., 2007b; Smith et al., 2010*). Smith et al. (2010) ont montré qu'un sevrage précoce à 15 jours, altère considérablement le développement de la fonction barrière de la muqueuse du jéjunum (***Figure 21***). Dans cette étude, les mêmes résultats ont été observés au niveau du côlon, suggérant que la fonction de barrière de l'ensemble du tractus intestinal est affectée. Cette étude a également montré que les effets du sevrage précoce sur la perméabilité épithéliale persistent dans le temps (*Smith et al., 2010*). L'âge du sevrage est donc un facteur très important dans l'altération de la perméabilité paracellulaire (*Moeser et al., 2007a; Smith et al., 2010; Wijtten et al., 2011*), probablement en raison de l'immaturité de l'intestin des porcelets les plus jeunes. Les différents facteurs de stress associés au sevrage, ainsi que la faible ingestion d'aliment après le sevrage, sont également impliqués dans l'altération de la perméabilité et de la fonction de barrière de l'intestin (*Spreeuwenberg et al., 2001; Wijtten et al., 2011*).

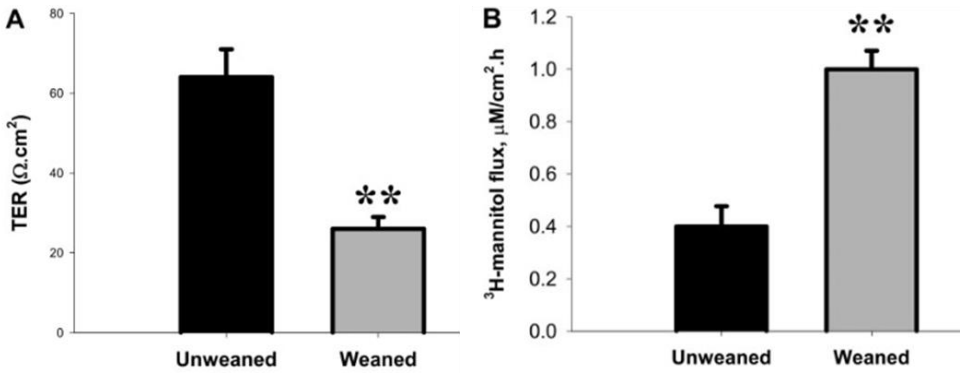


FIGURE 20 : EFFET DU SEVRAGE SUR LA PERMEABILITE PARACELLULAIRE DU JEJUNUM DU PORCELET.

A l'âge de 19 jours, des porcelets ont été sevrés (Weaned) ou ont continué l'allaitement (porcelets allaités témoins, Unweaned). Les tissus du jéjunum ont été collectés pour la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TER) et du flux du [^{3}H]-mannitol du pôle apical au pôle basal de la muqueuse. **(A) Impact du sevrage sur la TEER**. Le sevrage a induit une réduction significative de la TEER chez les porcelets sevrés par rapport aux porcelets témoins allaités (** : $p < 0,01$). **(B) Impact du sevrage sur le flux du [^{3}H]-mannitol.** Le sevrage a induit une augmentation significative du flux de [^{3}H]-mannitol chez les porcelets sevrés par rapport aux porcelets témoins allaités (** : $p < 0,01$). Les mêmes résultats ont été obtenu à partir de tissu de côlon pour la mesure de la TEER et du flux de [^{3}H]-mannitol. D'après Moeser et al. (2007a).

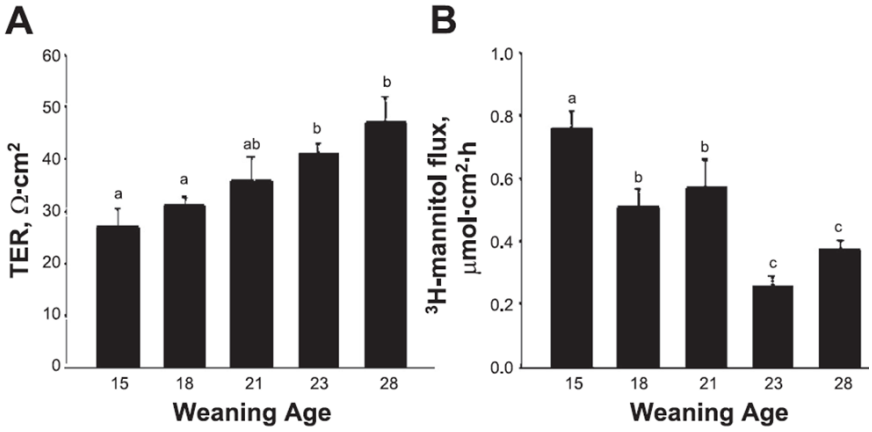


FIGURE 21 : EFFET DE L'AGE DU SEVRAGE SUR LA PERMEABILITE PARACELLULAIRE AU NIVEAU DU JEJUNUM DE PORCELET.

Des porcelets ont été sevrés à différents âges (15, 18, 21, 23 et 28 jours). Les tissus du jéjunum de tous les porcelets ont été collectés à 35 jours d'âge pour la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER), et du flux du [^{3}H]-mannitol du pôle apical au pôle basal de la muqueuse à l'aide de chambres de Ussing. **(A) Effet de l'âge du sevrage sur la TEER à 35 jours.** Les porcelets sevrés à l'âge de 15 jours présentent une TEER plus faible par rapport aux porcelets sevrés à l'âge de 23 jours et plus. **(B) Effet de l'âge du sevrage sur le flux du [^{3}H]-mannitol.** Les porcelets sevrés à l'âge de 15 jours présentent un flux de [^{3}H]-mannitol plus élevé par rapport à tous les autres âges de sevrage. D'après Smith et al. (2010).

La diminution de la TEER induite par le sevrage précoce des porcelets reflète le relâchement des **jonction serrées** entre les cellules épithéliales (*Wijtten et al., 2011; Hu et al., 2013*). Une diminution de l'expression des gènes codant pour les protéines occludine (OCLN), claudine-1 (CLDN1) et zona occludens 1 (ZO1 ou TJP1) est observée une semaine après le sevrage à 21 jours, coïncidant avec l'augmentation de la perméabilité paracellulaire (*Hu et al., 2013*). D'autres études ont également décrit une diminution de l'expression protéique des protéines occludine (OCLN), claudine-1 (CLDN1) et claudine-3 (CLDN3), zonula occludens-1, -2 et -3 (TJP1, TJP2 et TJP3) après le sevrage à 21-25 jours, en association avec la diminution de l'expression de ces gènes (*Wang et al., 2015; Cao et al., 2018; Saladrigas-García et al., 2021; Tang et al., 2021*).

Une diminution de l'épaisseur de la **couche de mucus** du côlon a été décrite chez des porcelets sevrés à 21 jours par rapport à des porcelets allaités du même âge (***Figure 22A et C***). Ces résultats étaient associés à une diminution du nombre de cellules en gobelet par crypte (*Tang et al., 2022b*)(***Figure 22B et D***). Une réduction du nombre de cellules en gobelet a également été observée dans l'intestin grêle de porcelets suite à un sevrage précoce (21 jours) (*Dunsford et al., 1991*). La réduction de l'épaisseur de la couche de mucus après le sevrage pourrait favoriser le passage d'agents pathogènes au travers de l'épithélium intestinal, contribuant aux infections entériques et à l'inflammation intestinale post-sevrage (*décrite en partie II.D ci-dessous*) (*Hu et al., 2013; Tang et al., 2022b*). L'expression du gène de la mucine 13 (MUC13, transmembranaire) est diminuée après le sevrage à 25 jours des porcelets au niveau du jéjunum et une tendance similaire est observée pour MUC2, la principale mucine secrétée (*Saladrigas-García et al., 2021*).

Le sevrage induit donc une réduction de la fonction barrière de l'épithélium intestinal permettant à des composés présents dans la lumière intestinale (micro-organismes, toxines, antigènes) de pénétrer à l'intérieur de l'organisme pouvant entrainer des infections, de l'inflammation et *in fine* des diarrhées post-sevrage (*Spreeuwenberg et al., 2001; Boudry et al., 2004; Pié et al., 2004; Moeser et al., 2007a; Tang et al., 2022b*).

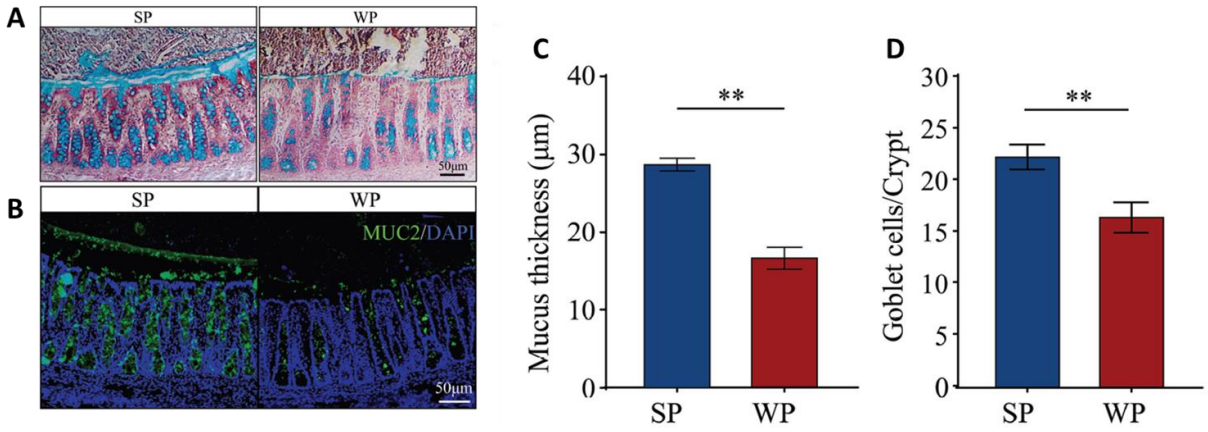


FIGURE 22 : EFFET DU SEVRAGE SUR LA COUCHE DE MUCUS ET LES CELLULES EN GOBELET.
Des porcelets de 21 jours ont été séparés en deux groupes : (i) des porcelets non sevrés témoins ont continués l'allaitement (SP, « suckling piglets ») ; (ii) des porcelets ont été sevrés (WP, « weaned piglets »). A l'âge de 25 jours les porcelets ont été sacrifiés et les tissus du côlon ont été collectés. **(A) Images représentatives de coupes de côlon** des groupes SP et WP colorées à l''acide périodique et de Schiff- bleu alcian (PAS-AB) marquant les mucines. **(B) Coupe de côlon observée en microscopie confocale** avec un marquage des noyaux (bleu) et de la mucine 2 (vert). **(C) Epaisseur de la couche de mucus** dans le côlon des porcelet non sevrés (SP) et sevrés (WP) mesuré à partir des images de coloration PAS-AB. **(D) Nombre de cellules gobelets productrices de mucus par crypte** dans le côlon des porcelet non sevrés (SP) et sevrés (WP). D'après Tang et al. (2021).

II.D. Réponses immunitaires intestinales et stress oxydant lors du sevrage des porcelets

La dysfonction de la barrière épithéliale lors du sevrage précoce est associée à un recrutement de cellules immunitaires, telles que les lymphocytes T et les mastocytes, impliquées dans la **réaction inflammatoire intestinale post-sevrage**. L'activation des mastocytes de la muqueuse semble être un facteur important dans la réduction de la fonction de barrière chez les porcs sevrés précocement (*Moeser et al., 2007b*). Au cours des premiers jours post-sevrage, une augmentation de l'expression des gènes des **cytokines inflammatoires** Interleukine-1β (IL-1β), Interleukine 6 (IL-6), Tumor necrosis factor-α (TNF-α) et Interféron-γ (IFN-γ) est observée au niveau du jéjunum (*Pié et al., 2004; Hu et al., 2013*). Cette augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoire pourrait être liée à une exposition accrue à immunostimulants (micro-organismes, antigènes alimentaires, mycotoxines) en lien avec l'affaiblissement de la fonction de barrière lors du sevrage (*McCracken et al., 1999; Boudry et al., 2004; Pié et al., 2004*). Cependant, la source cellulaire de ces cytokines n'est pas clairement définie et la contribution des cellules épithéliales pourrait être faible. Par ailleurs, les gènes des cytokines anti-inflammatoire IL-10 (Interleukines 10) et TGF-β (Transforming growth factor-β), protégeant de l'inflammation ne semblent pas affectés par le sevrage (*Hu et al., 2013*). Par ailleurs, le niveau d'expression des gènes des **toll-like receptor** 2 (TLR2) et 4 (TLR4) dans l'iléon de porcs est augmenté de manière transitoire au cours de la première semaine après un sevrage à 25 jours (***Figure 23***) (*Tao et al., 2015*).

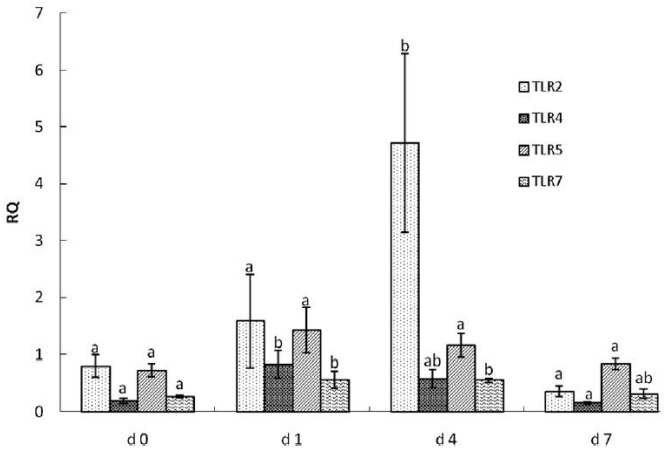


FIGURE 23 : EFFET DU SEVRAGE SUR L'EXPRESSION DES TOLL-LIKE RECEPTORS (TLR) DANS L'ILEON DE PORCELETS
Des porcelets ont été euthanasiés avant le sevrage (25 jours d'âge) (d0, porcelets allaités témoins) et à 1 (d1), 4 (d4) et 7 (d7) jours post-sevrage. Le tissu de l'iléon a été collecté pour l'analyse de l'expression des gènes des TLR. Pour un gène donné, des lettres différentes entre les différents temps représentent des différences significatives ($p < 0,05$). L'expression du gène TLR2 est augmentée à d4. L'expression du gène TLR4 est augmentée à d1. L'expression de TLR7 est augmentée à d1 et d4. Aucune différence significative n'est observée au cours du temps pour l'expression du gène TLR5. D'après Tao et al. (2015).

Les cytokines pro-inflammatoires peuvent avoir un effet sur les fonctions de l'épithélium intestinal. L'augmentation de l'exposition à la cytokines TNF-α stimulerait la sécrétion d'ion Cl^- (*détaillé en partie II.B*) et pourrait ainsi être impliquée dans le développement des diarrhées post-sevrage (*Pié et al., 2004*). De plus, la surexpression des cytokines pro-inflammatoires après le sevrage contribuerait à la

dysfonction de barrière intestinale via une déstabilisation des jonctions serrées (*Pié et al., 2004; Wijtten et al., 2011; Hu et al., 2013*). Il apparait donc que l'inflammation et la dysfonction de la barrière épithéliale sont deux phénomènes étroitement liés s'autoentrainant. D'autre part, une surexpression de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 diminue l'activité enzymatique de la sucrase isomaltase après le sevrage pouvant ainsi contribuer à une réduction de la digestion des glucides (*Pié et al., 2004*).

L'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires est souvent associée à des dommages oxydatifs qualifiés de **stress oxydant** (*Zheng et al., 2021*). Celui-ci est défini comme un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et leur élimination par des mécanismes antioxydants (*Cao et al., 2018*). Après le sevrage, l'expression des gènes codant pour la glutathione peroxidase, impliquée dans la réduction des hydroperoxydes organiques et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) protégeant ainsi les cellules contre les dommages oxydants, est diminuée après le sevrage (*Yin et al., 2014; Cao et al., 2018*). Le métabolisme des radicaux libres et le système antioxydant est donc perturbé lors du sevrage précoce des porcelets, ce qui entraine un stress oxydant (*Cao et al., 2018*).

II.E. Adaptation du microbiote intestinal lors du sevrage des porcelets

Le **microbiote intestinal** est un écosystème dynamique dont la diversité et la composition évoluent au cours du temps, de la naissance jusqu'à l'âge adulte, principalement sous l'influence de facteurs alimentaires (*détaillé dans le Chapitre 1, 0*). La **diversité bactérienne** est plus importante chez les porcelets après sevrage que chez les porcelets allaités (*Frese et al., 2015; Massacci et al., 2020*). Une ingestion précoce d'aliments solides (significative à 15 jours) par les porcelets allaités accélère cette augmentation de la diversité microbienne par rapport à des porcelets ayant reçu une alimentation lactée uniquement (***Figure 24A***) (*Choudhury et al., 2021*). Ces résultats indiquent que l'augmentation de la diversité bactérienne après le sevrage serait principalement due à l'apport de nouveaux substrats issus de céréales. Par ailleurs, retarder l'âge de sevrage des porcelets permet d'augmenter la diversité microbienne avant la sevrage (*Massacci et al., 2020*).

Après le sevrage précoce à 28 jours (ou moins), un changement soudain de la composition du microbiote est observé en raison du passage brutal d'un régime lacté à une alimentation solide (*Wang et al., 2019; Choudhury et al., 2021*). Au contraire, le changement de la composition microbienne se fait plus progressivement lorsque les porcelets allaités consomment précocement un aliment solide (***Figure 24B***). L'arrêt de l'allaitement diminue l'abondance de certaines bactéries, telles que les *Bacteroides* (*Frese et al., 2015; Zheng et al., 2021*)*.* spécialisées dans l'utilisation des oligosaccharides du lait (*Marcobal and Sonnenburg, 2012*). L'introduction d'aliments solides à base de céréales chez le porcelet modifie également la disponibilité des substrats pour les bactéries. De nombreuses études ont montré que l'abondance des bactéries tels que *Prevotella ou Roseburia* (famille des *Prevotellaceae* et *Lachnospiraceae*) augmentent consécutivement à cette transition alimentaire (*Frese et al., 2015; Mach et al., 2015; Beaumont et al., 2021b; Choudhury et al., 2021*) ces genres bactériens étant vraisemblablement favorisés par leur capacité à utiliser des glucides végétaux plus complexes et les fibres (*Chen et al., 2017a; La Rosa et al., 2019; Nie et al., 2021*).

Les **métabolites bactériens** sont des modulateurs clés de l'homéostasie intestinale et jouer un rôle décisif sur son maintien après le sevrage (*Tang et al., 2022b*). Une différence marquée de métabolome intestinal est observée entre des porcelets allaités et des porcelets sevrés (*Beaumont et al., 2021b; Tang et al., 2022b*). Le sevrage augmente particulièrement la concentration d'acide gras à courtes chaines (AGCC) produits par le microbiote par fermentation des glucides végétaux (*van Beers-Schreurs*

et al., 1998; Beaumont et al., 2021b). Cette augmentation reflèterait l'adaptation métabolique des bactéries intestinales en réponse aux nouveaux substrats végétaux disponibles après le sevrage. Les principaux AGCC issus de l'activité de fermentation des glucides par le microbiote dans l'intestin sont l'acétate, le propionate et le butyrate. Ceux-ci ont globalement des effets protecteurs sur la barrière intestinale et stimulent le système immunitaire (*Guilloteau et al., 2010; Koh et al., 2016*). Les effets du butyrate ont été décrit dans le Chapitre 1.

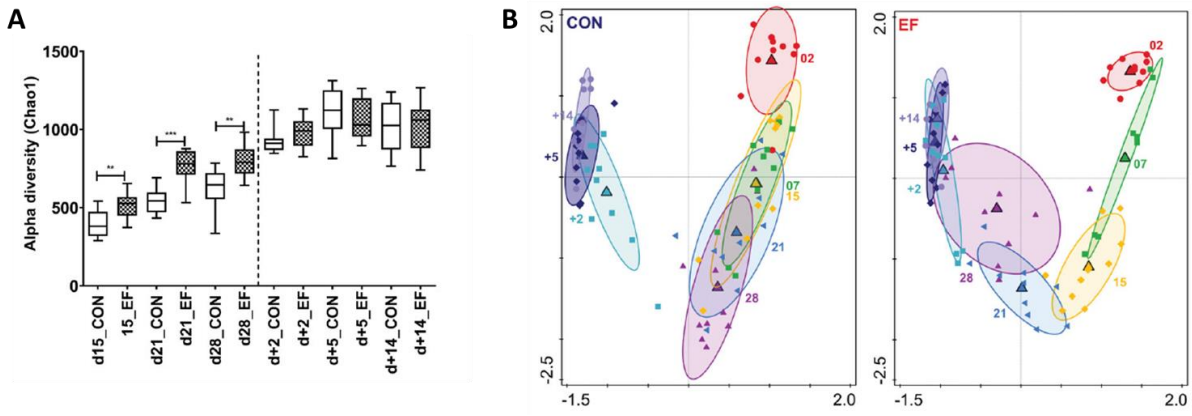


FIGURE 24 : COLONISATION DU MICROBIOTE DE PORCELETS ALLAITES ET ALIMENTES PRECOCEMENT COMPARATIVEMENT A DES PORCELETS EXCLUSIVEMENT ALLAITES.

Des porcelets ont été sevrés à l'âge de 28 jours. Les porcelets du groupe témoin (CON) été nourrit seulement avec du lait jusqu'au sevrage. Les porcelets du groupe EF (« early feeding ») ont eu accès à des aliments solide à partir de 2 jours d'âge en plus de l'allaitement, cependant l'ingestion d'aliment solide n'a été observé qu'à partir de 15 jours d'âge. **(A) Evolution de l'α-diversité entre les deux groupes CON et EF.** Des différences de diversité sont observés entre les deux groupes à partir de 15 jours et jusqu'à l'âge du sevrage. **(B) Analyse en composantes principales (ACP) de la composition microbiote à différents âges présentés séparément pour les groupes CON et EF.** La modification du microbiote observée lors du sevrage semble plus progressive chez les porcelets du groupes EF. Adapté de Choudhury et al. (2021).

En résumé

En élevage commercial conventionnel, le sevrage précoce des porcelets autour de 21 jours d'âge entraine de nombreuses perturbations de l'homéostasie intestinale lors d'une étape clé de la maturation du système digestif (***Figure 25***). Les importantes altérations de la morphologie de la muqueuse intestinale sont associées à une perturbation de la fonction de digestion et d'absorption de l'épithélium intestinal (***Figure 26***). De plus, le sevrage précoce entraine une perturbation généralement transitoire de la fonction de barrière de l'intestin caractérisée par une augmentation de la perméabilité, une réduction de la production de mucus, une activation des réponses inflammatoires et du stress oxydant. Ces changements coïncident avec d'importantes modifications de la diversité, de la composition et de l'activité métabolique du microbiote intestinal. L'ensemble de ces modifications induites par le sevrage précoce peut contribuer au développement de diarrhées post-sevrage. Il est donc nécessaire de développer des stratégies permettant de réduire ces altérations de l'homéostasie intestinale observées lors du sevrage afin de préserver le bien-être des porcelets et de réduire l'utilisation d'antibiotiques associée aux troubles digestifs post-sevrage.

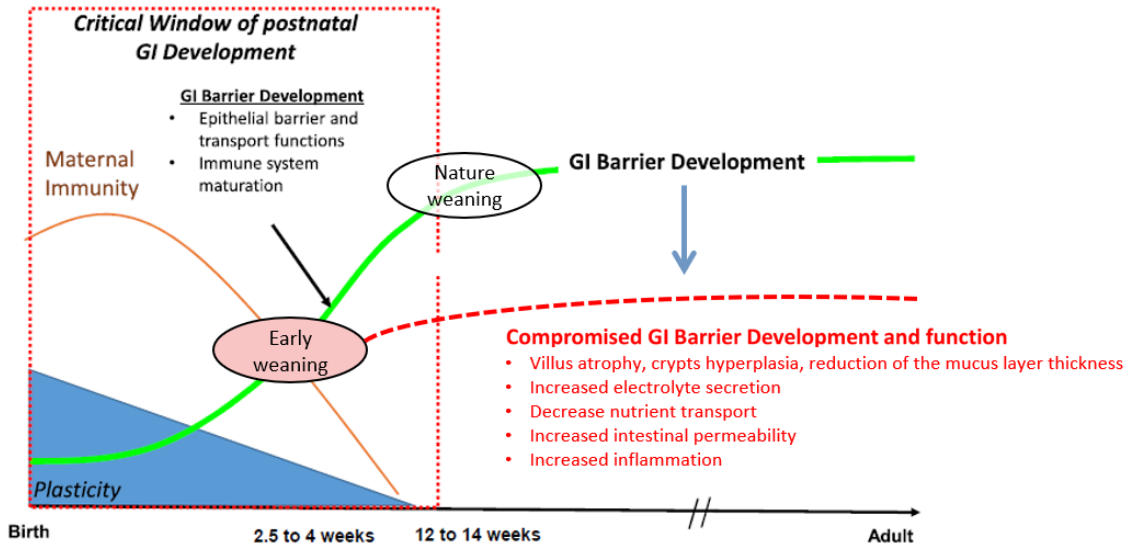


FIGURE 25 : DEVELOPPEMENT POST-NATAL DE L'INTESTIN CHEZ LE PORCELET ET IMPACT DU SEVRAGE PRECOCE
Le développement physiologique post-natal de l'intestin du porcelet est représenté en vert. En condition naturelle, le sevrage à lieu à la fin de cette étape de maturation (entre 12 et 14 semaines après la naissance). En conditions commerciales conventionnelles, le sevrage intervient au cours de la période de maturation, à un âge ou le porcelet dépend fortement de l'immunité passive, perturbant le développement physiologique de l'intestin avec des conséquences potentiellement à long terme (représenté en rouge). Adapté de Moeser et al. (2017).

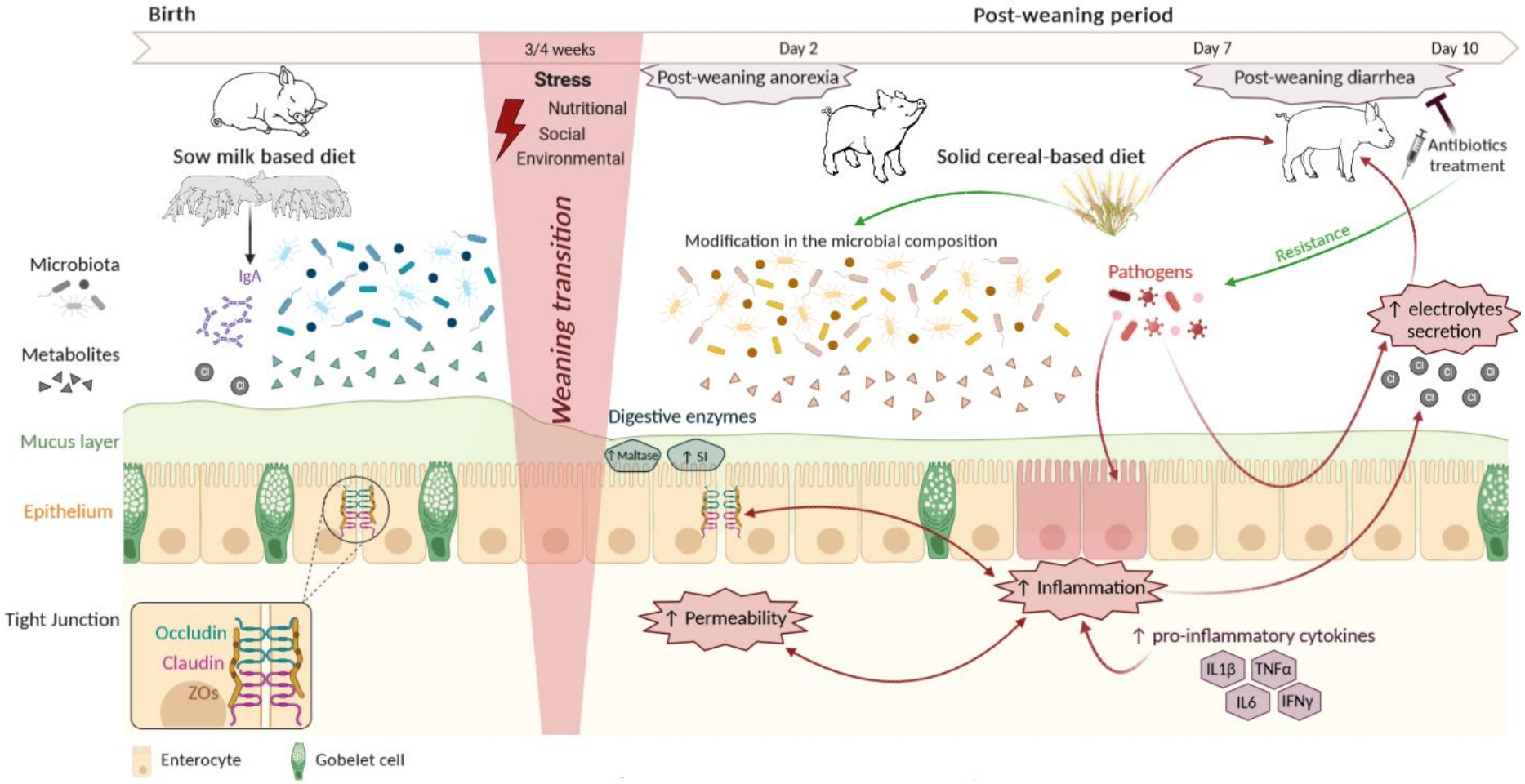


FIGURE 26 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MODIFICATIONS DE L'HOMEOSTASIE INTESTINALE OBSERVEE LORS DU SEVRAGE PRECOCE CHEZ LE PORCELET

Avant sevrage, le lait maternel apporte de nombreux facteurs protecteurs tel que les immunoglobulines A (IgA), permettant d'apporter une protection immunitaire passive au porcelet. Au moment du sevrage, de nombreux stress sont rencontrés, avec notamment la séparation de la mère, un changement d'alimentation et d'environnement. La composition du microbiote et la concentration des métabolites bactériens diffèrent entre les porcelets allaités et sevrés. Après le sevrage une diminution de l'épaisseur de la couche de mucus et une augmentation de la perméabilité sont observées. Une inflammation est également observée favorisant l'augmentation de la perméabilité, le relâchement des jonctions serrées et l'augmentation de la sécrétion d'ions. Toutes ces modifications favorisent l'apparition des diarrhées post-sevrage pouvant impliquer des pathogènes entériques. Les antibiotiques sont couramment utilisés pour limiter ces diarrhées, cependant ils contribuent à l'apparition des résistances aux antibiotiques ce qui constituent un problème de santé publique majeur.

III. Alternatives aux antibiotiques pour la prévention des diarrhées post-sevrage chez le porcelet

III.A. Problématique de l'antibiorésistance dans le contexte de la lutte contre les diarrhées post-sevrage des porcelets

Les **antibiotiques** sont des substances chimiques naturelles ou de synthèse permettant d'éliminer les bactéries ou de bloquer leur croissance. Dans l'industrie porcine, les antibiotiques étaient autrefois largement utilisés dans l'alimentation comme activateurs de croissance mais cette pratique est interdite en Europe depuis 2006 en raison de la contribution à l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques (*Heo et al., 2013; Maron et al., 2013; Barton, 2014*). Néanmoins, les antibiotiques sont encore couramment utilisés de manière préventive à des fins prophylactiques (sur un seul animal) et métaphylactiques (sur l'ensemble du groupe d'animaux) afin de prévenir et traiter l'apparition de maladies et en particulier des diarrhées post-sevrage des porcelets, principalement causées par des infections par des *E. coli* pathogènes ou des *Salmonelles* (*Heo et al., 2013; Maron et al., 2013; Barton, 2014*).

L'utilisation massive des antibiotiques en élevage porcin exerce une forte **pression sélective** sur les micro-organismes créant ainsi une situation idéale pour l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques (*Heo et al., 2013; Barton, 2014; Holmes et al., 2016*) via une augmentation de l'abondance de gènes bactériens de résistance aux antibiotiques, localisés au niveau d'éléments génétiques mobiles (plasmides) (***Figure 27***) (*Looft et al., 2012; Holmes et al., 2016; Gresse et al., 2017*). La pression de sélection effectuée par l'utilisation intensive des antibiotiques induit une augmentation du risque de propagation des gènes de résistance aux antibiotiques entre les bactéries présentes dans le tractus intestinal du porc et à des bactéries pathogènes pour l'Homme (*Barton, 2014*).

L'antibiorésistance et sa transmission affaiblissent l'efficacité des antibiotiques dans le traitement de certaines infections chez l'animal ou l'Homme et entrainent un manque de moyens efficaces pour traiter certaines infections en l'absence de nouveaux antibiotiques (*Barton, 2014; Gresse et al., 2017*). D'autre part, l'arrêt de l'utilisation des antibiotiques comme stimulateurs de croissance a entrainé une augmentation de la morbidité et de la mortalité après sevrage et une augmentation de la prévalence des diarrhées post-sevrage (*Heo et al., 2013*). Il est donc important de mettre en place des **stratégies alternatives efficaces** pour prévenir les diarrhées post-sevrage et améliorer la santé digestive des porcelets au moment du sevrage (*Heo et al., 2013; Gresse et al., 2017*).

Au-delà de la nécessité d'adapter les pratiques d'élevage (*exemple :* sevrage plus tardif), un certain nombre de stratégies peuvent être utilisées comme alternatives aux antibiotiques pour limiter les diarrhées post-sevrage chez le porcelet. Dans cette partie, une rapide introduction aux alternatives non-antibiotiques existantes sera faite, suivie d'une présentation plus détaillée de l'intérêt de produits issus de levures et de bactéries qui ont été étudiés dans le cadre de cette thèse.

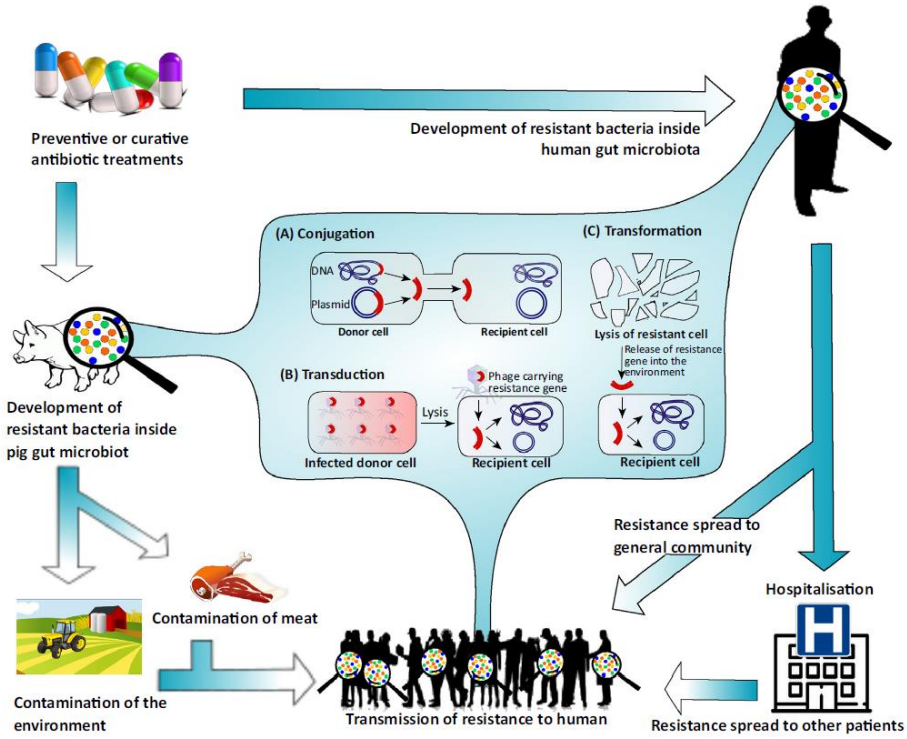


FIGURE 27 : MECANISME DE DISSEMINATION DE L'ANTIBIORESISTANCE

Les antibiotiques sont utilisés en médecine humaine et vétérinaire favorisant l'apparition de bactéries résistantes aux antibiotiques, notamment au niveau du microbiote intestinal. Les souches résistantes disséminées dans l'environnement augmentent la propagation des gènes de résistance parmi les populations bactériennes. Plusieurs mécanismes permettent aux bactéries d'acquérir une résistance aux antimicrobiens, tels que la conjugaison ou la fusion cellulaire survenant par contact cellulaire (A), la transduction phagique (B), ou la transformation à partir de fragments d'ADN prélevés directement dans l'environnement (C). La transmission de la résistance aux antibiotiques de l'animal à l'Homme peut se faire via la contamination environnementale due à l'industrie porcine ou via la chaine alimentaire. D'après Gresse et al. (2017).

III.B. Alternatives non-antibiotique existantes pour lutter contre les troubles digestifs post-sevrage chez les porcelets

La recherche d'alternatives aux antibiotiques pour lutter contre les diarrhées post-sevrage des porcelets est très active. L'**oxyde de zinc (ZnO)** est l'un des composés les plus efficace pour limiter les diarrhées post-sevrage des porcelets après le sevrage (*Heo et al., 2013; Gresse et al., 2017*). Le ZnO a en effet des propriétés antimicrobiennes mais ses effets potentiellement délétères sur le microbiote sont controversés et la législation européenne limite son utilisation en raison de son accumulation dans l'environnement (*Heo et al., 2013*). Les **huiles essentielles** possèdent des propriétés antimicrobiennes, antioxydantes ou antivirales mais leurs effets restent controversés et soulèvent des inquiétudes quant à leur éventuelle toxicité (*Gresse et al., 2017*). Un régime alimentaire moins riche en protéines avec une supplémentation en **acides aminés** est également une stratégie largement utilisée (*Heo et al., 2013*). D'autres solutions sont possibles comme l'utilisation de **vaccins**, contre les ETEC par exemple (*Gresse et al., 2017*).

Le concept de **prébiotiques** a été définit pour la première fois par Gibson and Roberfroid (1995), puis mis à jour en 2017 (*Gibson et al., 2017*). Un prébiotique est définit comme "un substrat dont

l'utilisation sélective par des micro-organismes confère un bénéfice à la santé de leur hôte" (*Gibson et al., 2017*). La supplémentation en prébiotiques chez les porcelets lors du sevrage pourrait permettre de créer un environnement plus favorable à la santé de l'intestin notamment par la modulation de la composition du microbiote et de son activité métabolique, permettant de renforcer la fonction barrière (*Lallès et al., 2007a; Heo et al., 2013; Gresse et al., 2017*).

Les **probiotiques** sont des micro-organismes vivants apportés par l'alimentation et ayant des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte (*Hill et al., 2014*). Les effets des probiotiques diffèrent en fonction du type de micro-organisme et des souches utilisés, mais aussi en fonction de l'alimentation et du statut sanitaire de l'environnement des porcelets (*Heo et al., 2013*). Les mécanismes d'action des probiotiques permettant une protection des porcelets contre les diarrhées post-sevrage pourraient impliquer (i) l'inhibition de l'adhésion de pathogènes à la muqueuse intestinale ; (ii) l'inhibition de la croissance des pathogènes ; (iii) la stimulation du système immunitaire et de la barrière intestinale ; (iv) la modulation de la composition et de l'activité du microbiote (*Heo et al., 2013*)

Le concept de **symbiotiques** désigne « un mélange comprenant des micro-organismes vivants (probiotiques) et un ou plusieurs substrats utilisés sélectivement par les micro-organismes de l'hôte (prébiotiques), qui confère un avantage pour la santé de l'hôte » (*Swanson et al., 2020*). Cependant, une limite à l'utilisation des probiotiques en nutrition animale concerne la difficulté de leur conservation pour maintenir en vie les micro-organismes d'intérêt, notamment en raison de leur sensibilité à l'oxygène et à la chaleur (*Salminen et al., 2021*). De plus, les probiotiques bactériens présentent certains risques tels qu'une possible translocation vers la circulation sanguine lorsque la barrière intestinale est affaiblie (*Lopetuso et al., 2017; Piqué et al., 2019*). Pour contourner ces limites, les **postbiotiques**, définis comme une "préparation de micro-organismes inactivés et/ou de leurs composants qui confère un avantage pour la santé de l'hôte", peuvent être utilisés tout en maintenant certains effets bénéfiques apportés par le micro-organisme vivant (*Salminen et al., 2021*). Les termes de « ghost probiotics » ou « parabiotics » peuvent également être utilisés pour nommer le même concept. Les postbiotiques présentent une meilleure stabilité que les probiotiques au cours du processus de stockage et ne présentent pas de risque infectieux. Les traitements thermiques sont les processus les plus utilisé pour inactiver les micro-organismes probiotiques (*Piqué et al., 2019*). Par exemple, la **tyndalisation** est un processus d'inactivation de micro-organismes par application de cycles de chauffage modéré (60°C, 30 min) suivi de refroidissements entrainant la germination de spores qui sont détruites lors du chauffage suivant. Une fois inactivées, les bactéries perdent leur capacité de reproduction et de transmission de gènes d'antibiorésistance (*Lopetuso et al., 2017*). Les probiotiques inactivés conservent néanmoins leurs principales propriétés. En effet, les postbiotiques peuvent moduler le microbiote, la barrière épithéliale et les réponses immunitaires via des composés microbiens tels que les pili et les parois cellulaires, des métabolites, des bactériocines ou d'autres protéines issues des micoorganismes probiotiques utilisés dans la préparation (***Figure 28***) (*Piqué et al., 2019; Salminen et al., 2021*).

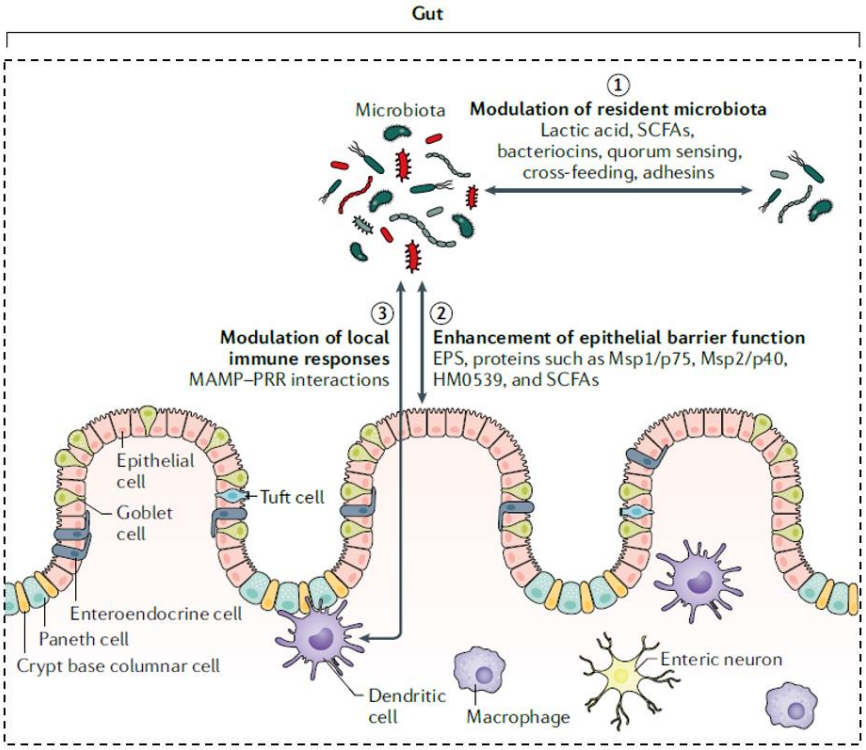


FIGURE 28 : MECANISMES D'ACTION DES POSTBIOTIQUES ET EXEMPLE DE MOLECULES EFFECTRICES.
Plusieurs mécanismes d'action des postbiotiques sont proposés : (1) modulation du microbiote résident via des molécules bactéricides/bactériostatiques (métabolites, bactériocines) ou via une modulation des communications microbiennes (« quorum sensing ») ou par compétition pour les sites d'adhésion ; (2) amélioration de la fonction barrière épithéliale par des composés pariétaux, des protéines ou des métabolites microbiens; (3) modulation des réponses immunitaires locales et systémiques via la reconnaissance de motifs moléculaires microbiens par des récepteurs spécialisés (Toll like receptor par exemple). **EPS,** : exopolysaccharide ; **MAMP :** motif moléculaire associé aux microbes ; **PRR :** récepteur de reconnaissance de motifs microbiens ; **SCFA :** acides gras à chaîne courte. Adapté de Salminen et al. (2021)

III.C. Présentation du YANG®, un postbiotique à base de levures

Les levures sont des micro-organismes eucaryotes, dont l'espèce la plus utilisée en tant que probiotique est ***Saccharomyces cerevisiae*** notamment en raison de sa forte résistance à l'environnement du tractus gastrointestinal (*Palma et al., 2015; Abid et al., 2022; Pang et al., 2022*). Cette souche de levure, couramment utilisée comme additif nutritionnel est, au-delà de ses propriétés probiotiques, une source de de protéines et d'acides aminés ainsi que de glutathion, un antioxydant important (*Abid et al., 2022*). Les modes d'action de *S. cerevisiae* sur l'hôte sont multiples avec notamment une activité antimicrobienne, un effet contre les toxines, une réduction de l'expression de gènes de l'inflammation et une inhibition de la mort cellulaire programmée (*Abid et al., 2022*). Chez le porcelet, une supplémentation de l'alimentation avec *S. cerevisiae* modifie le microbiote et favorise le développement de bactéries productrices d'AGCC (*Kiros et al., 2019*). La levure *S. cerevisiae* a également des effets protecteurs contre l'infection par les ETEC chez le porcelet, en limitant leur l'attachement à la muqueuse intestinale (*Daudelin et al., 2011; Trevisi et al., 2017*). Dans une étude *in vitro* utilisant la lignée cellulaire intestinale porcine IPEC1, le traitement avec la levure *S. cerevisiae* permet l'agglutination des ETEC et diminue l'expression des gènes de cytokines pro-inflammatoires

(*Zanello et al., 2011*). Cependant, dans cette étude, la levure ne protège pas de la dysfonction de la barrière intestinale indiquant que la levure *S. cerevisiae* n'agit pas sur les entérotoxines produites par les ETEC. Une autre étude *in vitro*, sur la lignée cellulaire porcine IPEC-J2, a montré que *S. cerevisiae* est capable de dégrader la mycotoxine DON, d'augmenter l'expression de cytokines anti-inflammatoires et de restaurer l'expression des gènes de protéines de jonctions serrées augmenté par le DON (*Liu et al., 2019*).

Les levures probiotiques sont utilisées vivantes mais également sous forme de **levures postbiotiques** dont l'utilisation bénéfique d'extraits de paroi cellulaire ou de cytoplasme de levures du genre *Saccharomyces* a été largement documenté. Les effets bénéfiques de ces postbiotiques à base de levures reposent principalement sur des composés pariétaux (*exemple :* β-glucan, mannan-oligosaccharides) ou cytoplasmiques (*exemple :* acides aminés, antioxydants). Par ailleurs, il existe d'autres souches de levures non-*Saccharomyces*, moins connues, pouvant également avoir des effets bénéfiques pour l'hôte (*Rawling et al., 2021*). Dans ce contexte, une nouvelle fraction de levures multi-souches inactivées, nommé **YANG®** (**Y**east **A**ssociation **N**ew **G**eneration), a récemment été développée par l'entreprise Lallemand, combinant l'utilisation de fractions de parois et de cytoplasme de *S. cerevisiae* (deux souches différentes) et d'une souche de levure *Cyberlindnera jadinii,* identifiée comme un antagoniste du champignon pathogène *Candida albicans* (*Rawling et al., 2021*). La supplémentation de l'alimentation de porcelets avec le YANG® après le sevrage diminue l'expression des gènes INF-γ, TNF-α, IL-6 et TLR-2 dans la muqueuse intestinale du jéjunum par rapport à des porcelets ayant reçu un aliment contrôle (*Upadhaya et al., 2019*). Ces résultats suggèrent que l'inflammation observée lors du sevrage chez le porcelet pourrait être atténué par une supplémentation alimentaire de YANG®. Au contraire, la supplémentation de l'alimentation avec le YANG® chez la truite arc-en-ciel augmente l'expression des gènes de cytokines pro-inflammatoires TNF-α et IL-1β et anti-inflammatoires IL-10 et TGF-β dans l'intestin postérieur (*Rawling et al., 2021*). La densité des cellules en gobelet est également augmentée au niveau de l'intestin antérieur et postérieur avec une supplémentation avec YANG® chez la truite arc-en-ciel. Les mêmes auteurs ont également montré que la combinaison des souches de levures présentes dans YANG® pourrait fournir davantage de motifs d'interactions avec les cellules immunitaires de l'hôte par rapport à une fraction de levure à souche unique (*Rawling et al., 2019*). En effet, le YANG® interagirait notamment avec les récepteurs TLR2 et Dectine-1. Des données internes de la société Lallemand obtenues chez le porc montrent que le YANG® a la capacité de se lier à *E. coli* avant qu'il n'infecte les cellules épithéliales en permettant l'agglutination et l'arrêt de la multiplication des *E. coli*. Cependant peu de données sur les effets directs du YANG® sur l'épithélium intestinal du porc sont disponibles. **Un des objectifs du travail de thèse était d'étudier les effets du YANG® sur les cellules épithéliales intestinales du porcelet à l'aide d'un modèle cellulaire approprié et représentatif de l'épithélium intestinal porcin.**

III.D. Présentation de la bactérie probiotique *Lactobacillus helveticus* R0052

Les bactéries probiotiques les plus étudiées et les plus utilisées actuellement appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (*Piqué et al., 2019*). Dans le cadre de cette thèse, la souche de la société Lallemand ***Lactobacillus helveticus* R0052** (aussi connue sous le nom *L. helveticus CNCM I-1722)* (*Messaoudi et al., 2011*) a été étudiée. Cette souche a été isolée d'un produit laitier et était initialement caractérisée comme *L. acidophilus* HA122.

Les principales connaissancessur la bactérie *Lactobacillus helveticus* R0052 ont été obtenues avec des étude utilisant la bactérie vivante. Un pré-traitement de cellules épithéliales intestinales humaines T84

avec *L. helveticus* R0052 protège de la dysfonction de la barrière épithéliale induite par les ETEC (*Sherman et al., 2005*). Par ailleurs, l'utilisation de *L. helveticus* R0052 en combinaison avec 2 autres souches bactériennes probiotiques (*Bifidobacterium longum subsp. Infantis* R0033 et*Bifidobacterium bifidum* R0071) protège de l'effet du poly(I-C), stimulant les réponses immunitaires antivirales via le TLR3, sur un modèle de cellules épithéliales intestinales humaines HT29 (*MacPherson et al., 2014*). Dans un modèle d'infection des cellules T84 par *Clostridiodes difficile*, *L. helveticus* R0052 a permis de réduire la sécrétion de 6 cytokines sur les 16 testées (*Gaisawat et al., 2022*). De plus, *L. helveticus* R0052 réduit l'invasion par le pathogène *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) au niveau des cellules épithéliales T84 (*Wine et al., 2009*). La souche *L. helveticus* R0052*,* possède une protéine de surface (SLP « S-Layer Protein), jouant un rôle dans l'inhibition de l'adhésion d'une souche d'E. coli entérotoxique et de *Campylobacter jejuni* par compétition pour les sites de liaisons aux cellules épithéliales (*Johnson-Henry et al., 2007; Wine et al., 2009; MacPherson et al., 2014; Piqué et al., 2019*). En effet, un pré-traitement de cellules épithéliales avec un extrait de SLP avant une infection avec *E. coli* réduit la diminution de la TEER et le flux de petites molécules (Dextran) indiquant un maintien de l'intégrité cellulaire et de la fonction barrière de l'épithélium (*Johnson-Henry et al., 2007; Piqué et al., 2019*).

L'identification de cette protéine SLP, effectrice des effets protecteurs de *L. helveticus* R0052 contre les infections, suggère sa possible utilisation en tant que postbiotique. Dans ce contexte, la souche *L. helveticus* R0052 tyndallisée (inactivée par la chaleur) est produite par Lallemand et son utilisation chez le porcelet est envisagée. Cependant, il n'existe pas de données sur les effets de cette souche probiotique inactivée sur l'épithélium intestinal du porcelet. **Un des objectifs du travail de thèse était donc d'étudier les effets du postbiotique *L. helveticus* R0052 sur l'épithélium intestinal porcin à l'aide d'un modèle cellulaire approprié.**

En résumé

De nombreuses alternatives aux antibiotiques sont en cours de développement pour préserver la santé digestive des porcelets lors du sevrage et ainsi limiter les diarrhées. L'utilisation de probiotiques inactivés (postbiotiques) semble être une stratégie prometteuse et relativement simple d'utilisation en comparaison des probiotiques vivants classiquement utilisés. Les effets bénéfiques des postbiotiques reposent généralement sur des composés issus de la paroi, du cytoplasme ou de sécrétions des probiotiques levures ou bactéries. Cependant, les effets des postbiotiques sur l'épithélium intestinal du porcelet sont peu connus, notamment dans le contexte du sevrage. Ce manque de connaissance est en partie du à l'absence de modèle efficace pour tester ces postbiotiques tout en limitant le recours à l'expérimentation animale.

Chapitre 3 : Les organoïdes intestinaux

L'étude de l'épithélium intestinal chez l'homme et l'animal nécessite des modèles performants (*Beaumont et al., 2021a*). Bien que les expérimentations sur les animaux restent incontournables pour étudier la physiologie de l'intestin, il existe une forte demande sociétale pour réduire ces approches *in vivo*. L'expérimentation sur les animaux est réglementée selon la règle des 3R, énoncée pour la première fois par Russel and Burch (1960). La règle des 3R vise à : (i) remplacer (« Replace ») les animaux utilisés par des alternatives, (ii) réduire (« Reduce ») le nombre d'animaux utilisés ; et (iii) raffiner (« Refine ») les expériences sur les animaux afin de causer un minimum de souffrance (***Figure 29***) (*Costa and Ahluwalia, 2019*). Récemment, Strech and Dirnagl (2019) ont proposés une amélioration de cette règle avec la prise en compte de la dimension de la valeur scientifique. Les auteurs suggèrent donc d'ajouter trois R supplémentaires : (i) la robustesse (« Robustness »), (ii) l'enregistrement (« Registration ») ; et (iii) la communication des résultats (« Reporting ») afin de préserver et d'augmenter la valeur scientifique de la recherche (***Figure 29***). **En respect de cette règle des « 6R », il est donc nécessaire de développer des modèles alternatifs à l'expérimentation animale tout en garantissant leur robustesse, c'est-à-dire leur pertinence biologique.** Cet objectif s'applique aux modèles d'étude de l'épithélium intestinal.

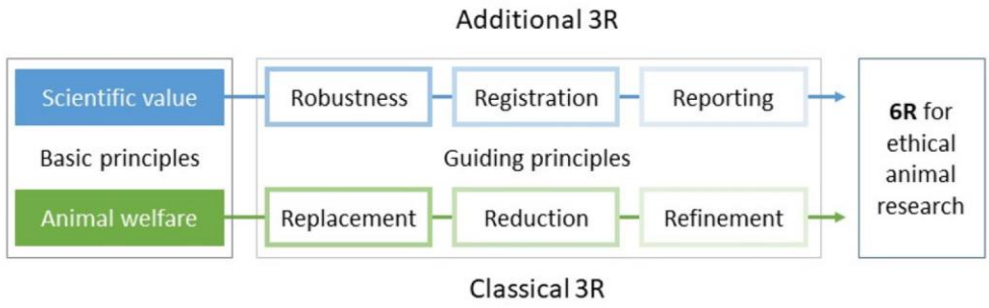


FIGURE 29 : PRINCIPES DE BASE POUR L'UTILISATION DES ANIMAUX ET L'ETHIQUE DE LA RECHERCHE
Issu de Strech and Dirnagl (2019)

L'utilisation de modèles *ex vivo/in vitro* permet de faciliter l'étude de l'épithélium intestinal dans un contexte simplifié, avec des conditions contrôlées et répétables tout en réduisant les dépenses (*Costa and Ahluwalia, 2019*). De plus, les modèles *in vitro* de cellules épithéliales permettent d'étudier spécifiquement l'épithélium, indépendamment des autres types cellulaires de l'organisme (*Ghiselli et al., 2021*). Dans ce chapitre, les principaux modèles d'étude de l'épithélium intestinal *ex vivo/in vitro* utilisés classiquement sont d'abord présentés brièvement. Ensuite, les modèles d'organoïdes intestinaux développés plus récemment sont présentés en détail. Les spécificités des modèles utilisés pour étudier l'épithélium intestinal du porc sont présentées quand ces informations sont disponibles.

I. Modèles conventionnels d'étude de l'épithélium intestinal

I.A. Le modèle d'explant d'intestin *ex vivo*

La **culture d'explants d'intestin *ex vivo*** consiste à cultiver dans un environnement artificiel des tissus intestinaux directement issus de l'animal d'intérêt (*Ghiselli et al., 2021*). Ce système de culture permet de conserver la complexité cellulaire et les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles du tissu (Randall et al., 2011; Beaumont et al., 2021a). Le système de culture *ex vivo* le plus utilisé est la **chambre de Ussing** (*Ghiselli et al., 2021*). Dans ce système, la muqueuse intestinale est placée entre deux compartiments permettant de mesurer la perméabilité paracellulaire et transcellulaire. Un intérêt majeur des modèles d'explant est de pourvoir étudier les interactions de l'épithélium avec les cellules immunitaires, mésenchymateuses et nerveuses. Cependant ce type de modèle *ex vivo* n'est pas adapté à la culture sur le long-terme en raison de leur viabilité généralement limitée à quelques heures (*Beaumont et al., 2021a; Ghiselli et al., 2021*). De plus, l'obtention de fragments de muqueuse intestinale nécessite le sacrifice d'animaux, ce qui va à l'encontre de la règle des 3R. Par ailleurs, la culture en chambre de Ussing nécessite un équipement couteux et complexe à utiliser *(Ghiselli et al., 2021*).

I.B. Les lignées de cellules épithéliales intestinales *in vitro*

Les **lignées de cellules épithéliales intestinales cultivées *in vitro*** constituent un modèle cellulaire standardisé et couramment utilisé pour l'étude de la fonction de barrière de l'épithélium, du transport des nutriments ou de l'effet d'agents pathogènes ou de toxines (*Ghiselli et al., 2021*). Les lignées cellulaires épithéliales intestinales peuvent être dérivées directement du tissu sain (lignée cellulaire primaire) ou de tumeurs (lignées cellulaires cancéreuses) (***Figure 30***). La **culture primaire** de cellules épithéliales intestinales reproduit fidèlement la composition cellulaire et la physiologie de l'épithélium mais présente une viabilité très limitée et n'est donc pas adaptée à la culture sur le long terme (généralement cultivées sur moins de 24h en raison de l'induction de l'anoïkis) (*Costa and Ahluwalia, 2019; Beaumont et al., 2021a*). Les lignées cellulaires les plus utilisées pour étudier l'épithélium intestinal sont les **lignées cancéreuses** humaine Caco-2, HT-29 et T84, toutes dérivées d'adénocarcinome colorectal (*In et al., 2016; Costa and Ahluwalia, 2019; Dutton et al., 2019*). Des modèles de lignées de cellules épithéliales dérivés d'intestin de porc ont également été développés, les plus utilisées étant les « Intestinal Porcine Enterocyte Cells » (IPEC). Ces lignées cellulaires sont dérivées de cellules de jéjunum (IPEC-J2) ou d'un mélange de cellules de jéjunum et d'iléon (IPEC-1) de porcelets nouveau-nés (*Ghiselli et al., 2021; Marks et al., 2022*). Les lignées IPEC-1 et IPEC-J2 sont non transformées et décrite comme non cancéreuses et spontanément immortalisées (*Nossol et al., 2015; Marks et al., 2022*). Cependant, une étude récente a montré que les cellules IPEC-J2 sont mutées dans le gène APC (Adenomatous polyposis coli), comme observé dans les cellules de cancer du côlon chez l'homme (*van der Hee et al., 2020*). Ces **dérives génétiques** ne représentent pas l'intestin sain (*In et al., 2016*) ce qui crée une situation peu physiologique pouvant impacter la robustesse des résultats (*Costa and Ahluwalia, 2019; van der Hee et al., 2020; Beaumont et al., 2021a; Ghiselli et al., 2021*).

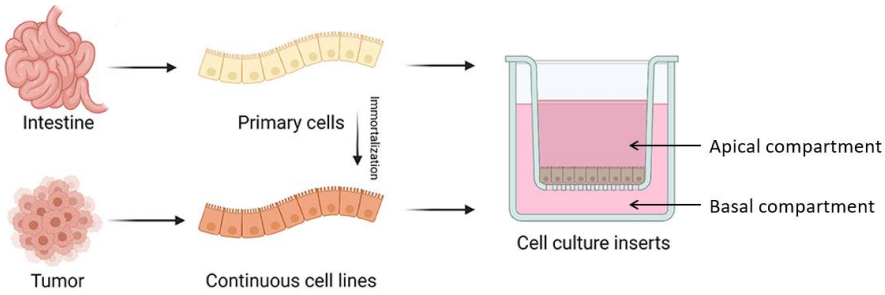


FIGURE 30 : REPRESENTATION DES DIFFERENTES SOURCES DE CELLULES POUR L'ELABORATION DE LIGNEE CELLULAIRE
Les cellules épithéliales peuvent provenir directement du tissu intestinal sain (culture primaire) ou de tumeurs. Les tumeurs intestinales génèrent des cultures cellulaires continues. Celles-ci peuvent également être obtenues par des techniques d'immortalisation de cellules primaires. Les cellules peuvent être ensemencées sur des inserts de culture pour créer des monocouches épithéliales formant une séparation entre un compartiment apical et basal. Adapté de Ghiselli et al. (2021).

Les **inserts de culture** constitués d'une membrane perméable sont largement utilisés pour recréer *in vitro* l'interface formée par l'épithélium intestinal (***Figure 30***). L'insert de culture permet la séparation du compartiment apical correspondant à la lumière intestinale et du compartiment basal correspondant au pôle sanguin (*Costa and Ahluwalia, 2019*). Ce système est largement utilisé pour l'étude de la fonction de barrière de l'épithélium intestinal avec des mesures de la résistance électrique transépithéliale (TEER) et des flux paracellulaires (*Ghiselli et al., 2021*). Les lignées cellulaires porcines IPEC-1 et IPEC-J2 cultivés sur insert forment une monocouche de cellules polarisées, avec des microvillosités orientées vers le compartiment apical, et connectées par des jonctions serrées (***Figure 31 A et B***) (*Schierack et al., 2006; Nossol et al., 2015; Costa and Ahluwalia, 2019; Ghiselli et al., 2021*). Dans ces conditions, la TEER des cellules IPEC-1 et IPEC-J2 augmente rapidement au cours du temps et est généralement supérieure à 1000 $\Omega.cm^2$, ce qui est plus élevé que *ex vivo* ou que dans les cellules Caco-2 (environ 500 $\Omega.cm^2$) (***Figure 31 C***) (*Nossol et al., 2011, 2015; Vergauwen, 2015*).

Par ailleurs, l'épithélium intestinal *in vivo* est constitué de différents types cellulaires tandis que les lignées cellulaires immortalisées ne présentent qu'**un seul type de cellules épithéliales** (*In et al., 2016; Dutton et al., 2019; Beaumont et al., 2021a; Marks et al., 2022*). Par exemple, les lignées de cellules épithéliales intestinales les plus couramment utilisées ne sécrètent pas de mucus. Cependant, il existe des lignées cellulaires qui sécrète du mucus *in vitro*, comme les sous-clones HT29-MTX (*Lesuffleur et al., 1990; Mahler et al., 2009; Costa and Ahluwalia, 2019; Ghiselli et al., 2021*). La mise en place de modèles de co-culture des lignées cellulaires Caco-2 et HT29-MTX permet de représenter les deux principaux types de cellules (cellules absorbantes et cellules en gobelet) présents dans l'épithélium de l'intestin (*Mahler et al., 2009; Pereira et al., 2016*). D'autres lignées cellulaires humaines existantes permettent de représenter les cellules entéroendocrines, telle que la lignée humaine NCI-H716 (*Mahler et al., 2009*), ou d'induire le phénotype des cellules M dans les cellules Caco-2 (*Pereira et al., 2016*). Des modèles complexes de co-culture peuvent donc être utilisés pour une meilleure représentation de la diversité cellulaire de l'épithélium intestinal ainsi que leurs interactions avec des cellules immunitaires (*Pereira et al., 2016; Gautier et al., 2022)*. Cependant cette diversité de lignées de différents types de cellules épithéliales n'est pas disponible pour le porc. Les cellules IPEC-J2 ont un phénotype de cellules absorbantes et n'expriment pas les gènes marqueurs de cellules en gobelet (*exemple : MUC2*) et des cellules enteroendocrines (*exemple : CHGA*) (*van der Hee et al., 2020*). Enfin, **il n'existe pas de lignées cellulaires spécifiques de chaque segment intestinal, ni de chaque stade de développement.**

L'ensemble des modèles conventionnels pour l'étude de l'épithélium intestinal présentent donc de nombreuses limitations et restent peu développés chez le porc (*Beaumont et al., 2021a*). Un modèle cellulaire *in vitro* idéal pour étudier l'épithélium intestinal devrait étroitement mimer les caractéristiques de l'épithélium observées *in vivo* chez l'espèce d'intérêt, notamment en reproduisant son architecture, les différents types cellulaires et pouvant être cultivé sur le long terme sans perdre ses caractéristiques notamment liées au segment digestif et au stade de développement (*Costa and Ahluwalia, 2019; Ghiselli et al., 2021*). L'identification de cellules souches intestinales (Lgr5+) dans les cryptes de l'intestin pour la première fois par Barker et al. (2007) a permis la culture à long terme des cellules primaires non transformées et d'aboutir au développement de modèle organoïdes dépassant les limites des modèles traditionnellement utilisés pour étudier l'épithélium intestinal *in vitro*.

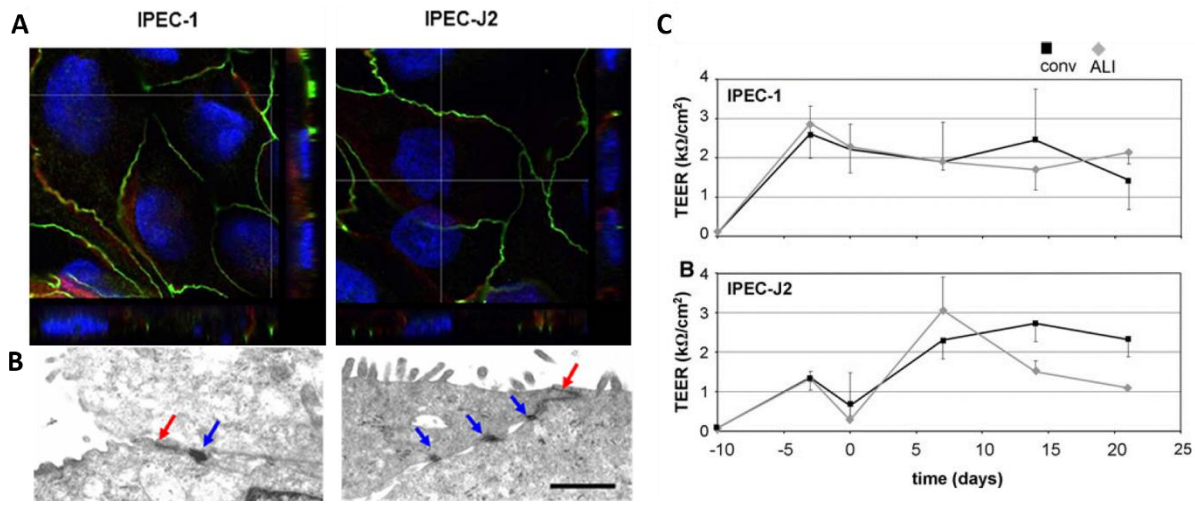


FIGURE 31 : CARACTERISATION DES CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES PORCINES IPEC-1 ET IPEC-J2
(A) Cellules épithéliales intestinales porcines IPEC-1 et IPEC-J2 observées en microscopie confocale. Les cellules IPEC-1 et IPEC-J2 ont été marquées pour la protéine de jonction serrée zonula occludens 1 (ZO-1, vert) et la β-caténine (rouge). Les deux lignées cellulaires ont montré une structure polarisée avec une localisation de ZO-1 au pôle apical et une expression sous-jacente de la β-caténine. Adapté de Nossol et al. (2015). **(B) Cellules épithéliales intestinales porcines IPEC-1 et IPEC-J2 observées en microscopie électronique à transmission.** Les cellules ont été analysées par microscopie électronique à transmission. Les deux lignées cellulaires présentent des jonctions serrées bien développées (flèches rouges) et des desmosomes (flèches bleues). Adapté de Nossol et al. (2015). **(C) Evolution de la résistance électrique transépithéliale (TEER) des lignées IPEC-1 et IPEC-J2.** Les cellules IPEC-1 et IPEC-J2 ont été ensemencées (jour -10) sur des inserts de culture et la TEER a été régulièrement mesurée. Au jour 0, les cultures ont été : (i) cultivées avec un milieu de culture conventionnel (conv, trait noir) ; (ii) cultivées en système air-liquide interface (ALI, trait gris) par retrait du milieu de culture apical (jour 0). Les cellules IPEC-1 et IPEC-J2 forment des tapis avec une TEER qui augmente au cours du temps avant d'atteindre un plateau. Adapté de Nossol et al. (2011).

II. Méthodes utilisées pour cultiver des organoïdes intestinaux

La **culture d'organoïdes intestinaux** *in vitro* a été décrite pour la première fois par Sato et al. (2009) à partir de tissus intestinaux murin, puis en 2011 à partir de tissus humain (*Sato et al., 2011a*). La culture d'organoïdes d'intestin est basée sur la reproduction *in vitro* du microenvironnement des cellules souches épithéliales, appelé « niche des cellules souches » (*décrit dans le Chapitre 1*). Dans ces

conditions, les cellules souches cultivées *in vitro* donnent naissance à des structures auto-organisées en trois dimensions (3D) appelées organoïdes. Les cellules des organoïdes s'auto-renouvellent et forment une monocouche de cellules épithéliales pouvant contenir tous les types cellulaires décrits *in vivo* et reproduisant certaines des fonctions de l'épithélium intestinal (*Barker, 2014; Almeqdadi et al., 2019; Costa and Ahluwalia, 2019; Ghiselli et al., 2021)*. Les paragraphes suivants présentent successivement quatre points clés de la culture des organoïdes : i) les cellules souches utilisées, ii) l'utilisation d'une matrice extracellulaire, iii) la composition du milieu de culture mimant le microenvironnement des cellules souches et iv) les passages et la congélation.

II.A. Origine des cellules souches utilisées pour cultiver des organoïdes intestinaux

Les organoïdes intestinaux peuvent être dérivés de plusieurs types de cellules souches. La technique la plus utilisé, la moins coûteuse et la plus simple à mettre en œuvre consiste à cultiver des **cellules souches épithéliales intestinales issues de tissus intestinaux**, généralement appelées ASC (« adult stem cells ») bien qu'elles puissent être isolées d'organismes en développement (stades fœtaux ou post-nataux). Ces ASC sont obtenues en **isolant des cryptes épithéliales intestinales** (***Figure 32***) par utilisation d'agent réducteurs des ponts disulfures (*exemple* : 1,4-dithiothreitol, DTT) permettant de déstabiliser la couche de mucus et les liaisons protéiques entre les cellules. De plus, l'utilisation d'agents chélateurs (*exemple :* ethylènediaminetétraacétique, EDTA) permet également de déstabiliser les jonctions cellulaires. Enfin, une dissociation mécanique permet de séparer les cryptes de la sous-muqueuse (*Stelzner et al., 2012; Mahe et al., 2015*).

Les organoïdes intestinaux peuvent également être dérivés de **cellules souches embryonnaires** (ESC : « embryonic stem cells ») issues d'embryons ou de **cellules souches pluripotentes induites** (iPSC : « induced pulripotent stem cells ») (***Figure 32***) (*Spence et al., 2011*). Contrairement aux organoïdes dérivées des ASC, les organoïdes intestinaux dérivés des ESC ou des iPSC ressemblent généralement plus à un intestin fœtal immature qu'à un intestin adulte (*Date and Sato, 2015; Dutton et al., 2019; Beaumont et al., 2021a*). De plus, les organoïdes issus d'ASC ne sont composés que de cellules épithéliales alors que les organoïdes dérivées des ESC ou des iPSC peuvent contenir également des cellules du mésenchyme (*Date and Sato, 2015; Beaumont et al., 2021a*). Les organoïdes intestinaux issus d'ASC sont obtenus en quelques jours mais l'obtention d'organoïdes à partir des iPSC est nettement plus longue (environ 1 mois) car ces cellules sont issues d'une dédifférenciation de cellules matures (*exemple :* fibroblastes) avant d'être ensuite différenciées en cellules intestinales.

Alors que de nombreuses études utilisant des ASC de porcs pour cultiver des organoïdes intestinaux ont été publiées, aucune étude n'a décrit en détail la culture d'organoïdes à partir des ESC ou des iPSC chez le porc. Cependant, Gao et al. (2019) ont décrit une méthode permettant l'obtention d'iPSC porcines. Ma et al. (2022) ont suggéré que les iPSC porcines pourrait permettre de générer des organoïdes intestinaux en utilisant les protocoles décrits chez l'homme compte tenu de la similitude entre les génomes porcins et humains. En effet, ces auteurs ont présenté des données préliminaires montrant un organoïde intestinal porcin dérivé d'iPSC. Au cours de cette thèse, seule la culture d'organoïdes à partir d'ASC sera détaillée.

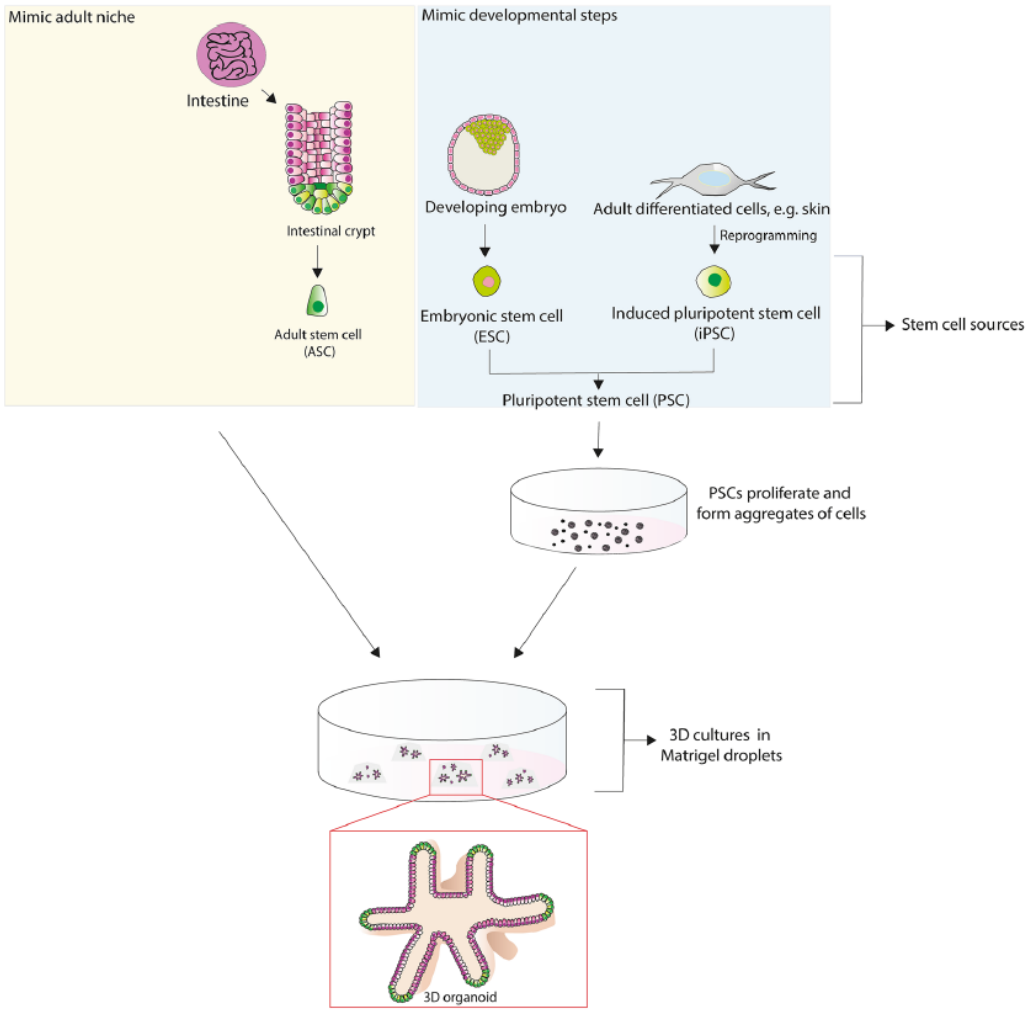


FIGURE 32 : TECHNIQUES D'OBTENTION DES CELLULES SOUCHES POUR LA CULTURE D'ORGANOÏDES INTESTINAUX. Les organoïdes peuvent être dérivés de cellules souches adultes (ASC) situées dans les cryptes de l'épithélium intestinal, isolées directement à partir du tissu d'intérêt à l'aide d'une solution de dissociation contenant des agents réducteurs et chélateurs. Les organoïdes peuvent également être dérivés de cellules souches embryonnaires (ESC) ou de cellules souches pluripotentes induites (iPSC). D'après Kar et al. (2021).

II.B. Reconstitution *in vitro* du microenvironnement des cellules souches épithéliales intestinales

II.B.1. Reconstitution *in vitro* de la matrice extracellulaire

In vivo, les cellules épithéliales intestinales adhèrent à la lame basale, composée de protéines structurelles essentielles à la survie des cellules (*Dutton et al., 2019*). Une perte de cet attachement à la matrice extracellulaire (MEC) induit un type de mort cellulaire appelé **anoïkis** *(Hofmann et al., 2007; Date and Sato, 2015; Merker et al., 2016*) (*décrit dans le Chapitre 1*). C'est pourquoi Sato et al. (2009) ont utilisé le **Matrigel®** comme matrice pour garantir la survie des cellules souches épithéliales *in vitro*. Le Matrigel® est une solution extraite de sarcomes murin Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) (*Date and Sato, 2015; Merker et al., 2016*). Cette tumeur est riche en diverses protéines de la MEC, telles que le collagène de type IV, certaines laminines et protéoglycanes. Le Matrigel® fournit également des

signaux chimiques (*exemple :* EGF, TGF) nécessaires à l'auto-renouvellement, à la prolifération et à la différenciation des cellules souches intestinales *in vitro* (*Dutton et al., 2019; Beaumont et al., 2021a*). Le Matrigel® favorise ainsi la survie et la croissance des cellules tout en fournissant un support structurel sur lequel les cellules vont pouvoir s'ancrer et former une structure en 3D.

L'utilisation de Matrigel® présente cependant certains inconvénients (*Kim et al., 2022*). Cette solution extraite d'une tumeur présente un risque de transfert de molécules immunogènes posant des problèmes d'activation des réponses immunitaires innés dans les organoïdes. De plus, des variations de composition non contrôlées d'un lot à l'autre de Matrigel® peuvent impacter la culture d'organoïdes et la reproductibilité des expériences. Par ailleurs, son coût est très élevé et fait appel à l'utilisation de souris pour sa production. Des alternatives, tel que le collagène, ou des hydrogels synthétiques de poly(éthylène glycol) (PEG) ont été testées comme MEC pour la culture d'organoïdes *(Merker et al., 2016; Kim et al., 2022*). Cependant ces MEC semblent diminuer l'efficacité de la culture (*Merker et al., 2016*) et, contrairement au Matrigel®, elles ne permettent pas de reconstituer l'ensemble complexes des protéines de la lame basale (*Kim et al., 2022*). Ces matrices synthétiques ou naturelles doivent donc être améliorées pour favoriser le développement et la maturation des organoïdes. Récemment une étude a proposé des hydrogels décellularisés dérivés de tissus gastrointestinaux comme source de MEC, permettant de contourner les principales limites du Matrigel® (*Kim et al., 2022*). Néanmoins, les organoïdes semblent rester dans un état plutôt immature lors de la culture avec ces hydrogels décellularisés.

La MEC *in vitro* ne fournit pas tous les signaux nécessaires au maintien de l'homéostasie des cellules souches épithéliales intestinales. C'est pourquoi il est nécessaire d'ajouter un milieu de culture permettant d'apporter les différents signaux nécessaires à l'homéostasie des cellules souches.

II.B.2. Reproduction *in vitro* de la niche des cellules souches épithéliales intestinales

Le **milieu de culture** des organoïdes intestinaux est basé sur l'utilisation de facteurs définis agissant sur des voies de signalisation régulant la physiologie des cellules souches intestinales ainsi que l'équilibre prolifération/différenciation. Le milieu de base pour la culture des cellules souches intestinales est composé du milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM « Dulbecco's Modified Eagle Medium ») complété par du Glutamax (une forme stable de la glutamine), du sérum de veau fœtal (SVF), de l'HEPES, de la N-acétylcystéine (NAC) et des antibiotiques/fongicides. Ce milieu de culture de base fournit un milieu tampon contenant des acides aminés, du glucose, des vitamines, des hormones et des antioxydants nécessaire à la croissance des cellules ainsi qu'une protection contre les contaminations bactériennes/fongiques (*Merker et al., 2016; Holmberg et al., 2017*).

En plus de ces composants de base, le milieu de culture des organoïdes contient de nombreux facteurs apportés sous forme de protéines (recombinantes ou issues de milieux conditionnés produits par des lignées cellulaires transfectées par des plasmides d'expressions) et de petite molécules (inhibiteurs pharmacologiques). Les principaux facteurs utilisés dans le milieu de croissance des organoïdes intestinaux, leurs mécanismes d'action et leurs effets sont résumés dans le ***Tableau 2***.

TABLEAU 2 : PRINCIPAUX REACTIFS, FACTEURS DE CROISSANCE ET DE DIFFERENCIATION UTILISES DANS LES MILIEUX DE CULTURE DES ORGANOÏDES INTESTINAUX

Composantd u milieu	Mécanisme d'action	Effet sur les cellules souches intestinales et application
Facteurs favorisant la prolifération cellulaire		
Wnt3a	Activation de la voie de signalisation Wnt canonique	Stimule la prolifération et maintien de l'état indifférencié des cellules souches
R-spondine	Activation de la voie de signalisation Wnt canonique	Stimule la prolifération et maintien de l'état indifférencié des cellules souches
CHIR99021	Inhibiteur de la GSK3, agoniste de la voie canonique de Wnt	Stimule la prolifération des cellules souches
EGF	Activation de la voie RAS/RAF/MEK/ERK	Stimule la migration, la prolifération des cellules souches et inhibe l'apoptose
PGE2	Renforce la voie de signalisation WNT canonique	Augmente la survie (prévient l'anoïkis) et favorise la prolifération des cellules souches améliorant ainsi l'efficacité de la culture
Jagged-1	Stimulation de la voie de signalisation Notch	Préserve l'état indifférencié des cellules souches, favorise la prolifération, bloque la différenciation sécrétoire
Facteurs inhibant la différenciation cellulaire		
Noggin	Inhibiteur de la voie de signalisation des BMP	Favorise la prolifération par inhibition de la différenciation induite par les BMP
SB431542 ou A83-01	Inhibiteur de la voie du TGF-β via l'inhibition des ALK4, 5 et 7	Inhibe la différenciation cellulaire
SB202190	Inhibiteur de la voie de signalisation p38 MAPK	Inhibe la différenciation via la voie des BMP et maintien à long terme les cellules souches intestinales en culture
LDN193189	Inhibiteur de la voie BMP via l'inhibition des récepteurs ALK 2 et 3	Bloque la différenciation cellulaire
LY215799	Inhibiteur du récepteur du TGF-β	Bloque la différenciation cellulaire
Autres		
Y27632	Inhibiteur ROCK	Prévient l'anoïkis induite après la dissociation des cellules et améliore la survie cellulaire. Utilisé dans les phases initiales de culture
Nicotinamide	Inhibiteur des sirtuines	Améliore le maintien des cellules souches et prolonge la culture des organoïdes
Gastrine	-	Améliore l'efficacité de la culture
B27 et N2	Mélange complexe d'enzymes antioxydantes, d'hormones, de métabolites, vitamines et acides gras	Suppléments sans sérum utilisé pour favoriser la croissance et la viabilité cellulaire. Permet de remplacer le SVF
HEPES	-	Tampon permettant le maintien du pH à 7
NAC	-	Antioxydant limitant les dommages cellulaire et prévenant l'apoptose

ALK : activine receptor like kinase ; **BMP :** Bone morphogenic protein ; **HEPES :** 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid ; **GSK3 :** glycogène synthase kinase 3 ; **ROCK :** Rho-associated protein kinase ; **SVF** : serum de veaux fœtal. Adapté de Holmberg et al. (2017).

Le principal acteur contrôlant la prolifération des cellules souches et la croissance des organoïdes intestinaux est la **voie de signalisation Wnt** (*détaillé dans le Chapitre 1*). *In vitro*, la voie Wnt est activé à l'aide des protéines **Wnt3A** et **R-spondin** (*Sato et al., 2011a*) sous forme recombinante ou apportées par un milieu conditionné produit à partir de lignées cellulaires, tel que la lignée L-WRN produisant les protéines Wnt3A, R-Spondine1 et Noggin (*Powell and Behnke, 2017*). L'activation de la voie de signalisation WNT peut être amplifié par l'ajout de facteurs supplémentaires, tel que **CHIR99021** et **PGE2** (***Figure 33***). Les effets de l'activation de la voie Wnt sur la prolifération et le maintien des cellules souches peuvent être amplifiés par activation de la **voie de signalisation Notch**, par exemple en ajoutant la protéine **Jagged-1** dans le milieu de culture des organoïdes.

L'**EGF** (« Epidermal Growth factor ») joue un rôle important pour la croissance et la prolifération cellulaire (*détaillé dans le Chapitre 1*) et est un élément essentiel pour la culture des cellules souches à long-terme (*Sato et al., 2009; Date and Sato, 2015*). En effet, une inhibition du récepteur à l'EGF (EGFR) diminue le taux de prolifération des cellules dans les organoïdes intestinaux humain *(Matano et al., 2015*). L'inhibition de la protéine p38 par **SB202190** diminue la dégradation du récepteur de l'EGF et stimule ainsi la prolifération et le maintien à long terme des cellules souches (***Figure 33***) *(Holmberg et al., 2017*).

L'inhibition de la **voie de signalisation BMP/TGF-β**, impliquée dans la différenciation cellulaire (*détaillé dans le Chapitre 1*), est essentiel pour le maintien des cellules souches en culture. L'ajout de la protéine **Noggin** (antagoniste de la voie des BMP) recombinante ou issue de milieux conditionnés (*exemple :* cellules L-WRN) est nécessaire pour le maintien de l'expression de Lgr5 et pour la culture d'organoïdes intestinaux à long terme (*Sato et al., 2009, 2011a; Powell and Behnke, 2017*). Sans cet antagoniste de la voie des BMP, les organoïdes cessent de proliférer après 1 à 2 semaines de culture. De plus, des inhibiteurs du récepteurs TGF-β, tels que **A83-01** ou **SB431542** ou **LY215799**, sont utilisés dans le milieu de culture des organoïdes intestinaux afin de maintenir l'état indifférencié des cellules souches et prolonger la culture (*Sato et al., 2011a*).

Lors de la mise en culture, les cellules épithéliales sont dissociées et subissent un niveau de stress important. L'inhibiteur de la protéine Rho-kinase (**Y-27632**) est ajouté en début de culture afin de prévenir l'anoïkis (*Sato et al., 2011a*). La vitamine **nicotinamide** peut également être ajoutée au milieu de culture afin de prévenir l'apoptose des cellules (*Holmberg et al., 2017*). De plus, la composition de ce milieu peut être adaptée pour **induire la différenciation des organoïdes** en réduisant la concentration des « facteurs de la niche des cellules souche » Wnt3A et R-spondine1 (*Mussard et al., 2020*) ou encore par l'ajout de **DAPT** (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl-L-alanyl)]-(S)-phenylglycine t-butyl ester), un inhibiteur de la voie Notch favorisant la différenciation des cellules épithéliales sécrétrices (*VanDussen et al., 2015*).

Le milieu de culture décrit ci-dessus, contenant différents facteurs, est personnalisable et flexible mais sa préparation est chronophage notamment pour la production des milieux conditionnés, et peut manquer de reproductibilité en raison de la variabilité potentielle de la concentration des facteurs entre chaque lot de production. En alternative, il existe un milieu de culture commercial prêt à l'emploi, nommé **IntestiCult™ Organoid Growth Medium (OGM),** disponible dans deux formulations optimisées pour la culture des organoïdes intestinaux humains et murins (*Beaumont et al., 2021a; Ma et al., 2022*). Ce milieu est plus couteux et la composition n'est pas connue ni modulable mais il a été utilisé dans de nombreuses publications.

Initialement développés pour la souris puis l'homme, les milieux de culture utilisés pour les organoïdes intestinaux ont récemment été adaptées à d'autres espèces, dont le porc (*Beaumont et al., 2021a*). La forte conservation évolutive des voies de signalisation ciblées par les constituants des milieux de

culture des organoïdes facilite la transposition des protocoles utilisés pour la culture des cellules souches intestinales humaines à d'autres espèces (*Sato et al., 2011a; Powell and Behnke, 2017; Holthaus et al., 2021*). La culture **d'organoïdes intestinaux porcins** a été initiée en 2013 par Gonzalez et al. à partir d'ASC isolées de jéjunum de porcelets âgés de 14 jours. Depuis, des organoïdes porcins ont été développés pour les autres segments intestinaux (duodénum, iléon et côlon) en utilisant divers milieux de culture composés des constituants décrits ci-dessus (***Tableau 3***). En particulier, le milieu commercial **IntestiCult™ OGM** formulé pour les organoïdes humains permet la culture des organoïdes intestinaux de porc. Les organoïdes intestinaux de porc sont aujourd'hui couramment utilisés pour étudier les effets sur l'épithélium intestinal de nutriments, d'infections entériques ou de toxines (***Tableau 3***). Ce modèle est également accessible à la manipulation génétique pour la modélisation de maladies ou pour étudier des mécanismes moléculaires.

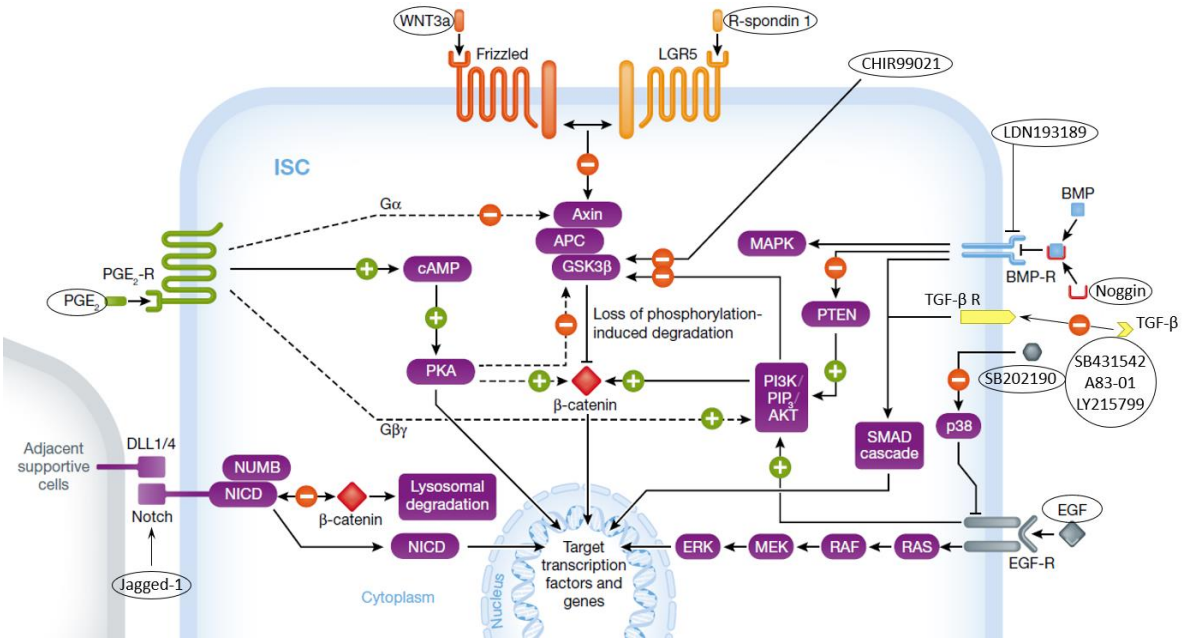


FIGURE 33 : MODE D'ACTION DES PRINCIPAUX COMPOSANTS DU MILIEU DE CULTURE DES ORGANOÏDES INTESTINAUX
L'activation de la voie WNT inhibe la dégradation de la β-caténine permettant sa translocation vers le noyau de la cellule et l'activation des gènes cibles. L'inhibition de la voie des BMP et l'activation de la voie de l'EGF augmentent les niveaux nucléaires de la β-caténine. CHIR99021 augmente la signalisation de la voie WNT et la prolifération cellulaire par l'inactivation de la GSK3β. La PGE_2 favorise également la stabilité de la β-caténine par l'inhibition de la GSK3 ou par l'activation de la voie PI3K/PIP3/AKT. SB202190 inhibe p38, diminuant ainsi la dégradation du récepteur de l'EGF induite par le ligand et favorisant le maintien à long terme des cellules. Jagged-1 stimule la voie de signalisation Notch et préserve l'état indifférencié des cellules et la prolifération. SB431542, A83-01 et LY215799 sont des inhibiteurs de la voie TGF-β et bloquent la différenciation des cellules. L'EGF stimule la migration, la prolifération des cellules souches et inhibe l'apoptose. SB202190 permet de stabiliser le récepteur de l'EGF via l'inhibition de la protéine p38. Enfin, le LDN193189 et Noggin bloquent la différenciation cellulaire via la voie des BMP. Adapté de Holmberg et al. (2017).

TABLEAU 3 : DESCRIPTIONS DES ETUDES UTILISANT DES ORGANOÏDES INTESTINAUX DE PORC (1/2)

Segment	Application	Crypt isolation	Growth medium	Reference
Duodenum	Lipopolysaccharides challenge	30 mM EDTA, 1.5 mM DTT, 4 °C, 20 min + 30 mM EDTA, 10 µM Y27632, warm, 10 min	DMEM, N2, B27 without vitamin A, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 1 µg/mL R-spondin1, 100 ng/mL Noggin, 50 ng/mL EGF, 2.5 ng/mL Wnt-3a	(Koltes and Gabler, 2016)
	Gene edited pigs	1 mg/mL collagenase, 2 mg/mL BSA, 37 °C, 30 min	IntestiCult™ Organoid Growth medium (Human)	(Engevik et al., 2020)
	Infection and Co-Infection with *T. gondii* and *G. duodenalis*	-	DMEM/F12, 50% L-WRN-CM, 20% R-Spondin1 CM, 10% Noggin CM, 50 ng/ml EGF, 1 mM HEPES, 2 mM GlutaMax, N2, B27, 1 mM NAC, 10 mM nicotinamide, 500 nM A83-01 and 1 mM SB202190, 10 µM Y27632. **Differentiation medium:** DMEM/F12, 5% R-spondin-1 CM, 5% Noggin CM, 1 mM HEPES, 2 mM GlutaMax, 1× N2, 1× B27, 1 mM NAC, 50 ng/ml EGF	(Holthaus et al., 2021)
Jejunum	Cell lineage identification	30 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 µM Y27632, 4 °C, 20 min and 37 °C 10 min	DMEM/F12, N-2, B-27 minus vitamin A, Glutamax, 1 mM HEPES, 1 mM NAC, 100 ng/mL rm Noggin, 500 ng/mL rhR-spondin, 50 ng/mL rm EGF, 100 ng/mL rh Wnt3a, 10 µM Y-27632, 10 µM SB202190, 500 nM LY2157299	(Gonzalez et al., 2013)
	Lentivirus transduction	10 mM EDTA, 1 mM DTT, 4 °C, 30 min	DMEM/F-12, 2 mM glutaMAX, 10 mM HEPES, 1 mM NAC, N2, B27, 50 ng/mL rm EGF, 100 ng/mL rm Noggin, 500 ng/mL rh R-spondin 1, Wnt3a CM, 1 mM valproic acid, 10 mM nicotinamide, 2.5 µM CHIR99021, 10 µM Y27632, 10 µM SB202190, 500 nM LY2157299	(Khalil et al., 2016)
	Transcriptomics	2 mM EDTA, 4 °C, 30 min	DMEM/F12, 10 mM HEPES, B-27, 1.25 mM NAC, 50 ng/mL rhEGF, 15 nM gastrin, 10 mM nicotinamide, 10 µM p38 MAPK inhibitor, 600 nM A83-01, Noggin CM (15% v/v), R-spondin CM (15% v/v), and Wnt3A CM (30% v/v)	(van der Hee et al., 2018, 2020)
	Mycotoxin challenge	30 mM EDTA, 1.5 mM DTT, 10 µM Y27632, 4 °C, 30 min	DMEM, 10% FBS, N2, B27, 1X GlutaMAX, 1 mM NAC, 50 ng/mL EGF, 100 ng/mL Noggin, 500 ng/mL R-spondin1, 10 mM nicotinamide, 10 µM SB202190, 0.5 µM LY2157299, 45% Wnt3a CM, 10 µM Y27632 (2–3 first days)	(Li et al., 2019c)
	Heat Stress	30 mM EDTA, 1.5 mM DTT, 4 °C, 30 min	DMEM/F12, Wnt3a CM, rm EGF, rm Noggin, rh R-spondin1, nicotinamide, Y27632, LY2157299, SB202190, CHIR99021, FBS, N2, B27, glutamine, NAC	(Zhou et al., 2020)
	Swine enteric virus infection (apical out enteroids)	5 mM EDTA, 4 °C, 1 h	IntestiCult™ Organoid Growth medium (Human)	(Li et al., 2020)
	S. Typhimurium and *T. gondii* infection	0.8 mM EDTA, 4 °C, 30 min	IntestiCult™ Organoid Growth medium (Human)	(Derricott et al., 2019)
	Physiological and pathophysiological properties of pig intestine	EDTA, on ice, 90 min, on an orbital shaker	Advanced DMEM/F12, 2 mM GlutaMax, 50% L-WRN CM, 10 mM HEPES, P/S, B27 supplement, 50 ng/mL rm EGF, 1 mM NAC, 10 µM Y27632, 500 nM A83-01, 10 µM SB202190, 10 nM Gastrin 1	(Hoffmann et al., 2021)
	Age-dependent Citrulline synthesis	EDTA-chelating buffer, 4°C, 30 min in a shaker	DMEM/12, Wnt3A CM, R-Spondin1 CM, Noggin CM, rh EGF, Gastrin I	(Mohammad et al., 2020)

TABLEAU 3 : DESCRIPTIONS DES ETUDES UTILISANT DES ORGANOÏDES INTESTINAUX DE PORC (2/2)

Segment	Application	Crypt isolation	Growth medium	Reference
Jejunum	Vitamin A	2 mM EDTA, 4 °C, 30 min	Wnt3a, Noggin and R-spondin 1 CM, B27, N2, glutamine, NAC, rm EGF, nicotinamide, SB202190	(Wang et al., 2020c)
	L-glutamate		Wnt3a, Noggin, and R-spondin1 (WRN)-CM, 10% FBS, 50 ng/mL rm EGF, 1 mM NAC, 10 mM nicotinamide, 10 µM Y27632, N2, B27 0.5 µM LY2157299, 10 µM CHIR99021, and 10 µM SB202190	(Zhu et al., 2020)
Ileum	Model development	Collagenase, 37 °C, 1.5 h	50% (DMEM + 10% FBS), 50% L-WRN CM, 10 µM SB431542, 10 µM Y27632	(Powell and Behnke, 2017)
	Mucus production	30 mM EDTA, 1 mM DTT, 37 °C, 10–15 min	IntestiCult™ Organoid Growth medium (Human)	(Ferrandis Vila et al., 2018)
	Lawsonia intracellularis infection	30 mM EDTA, 1 mM DTT, 37 °C, 5–15 min	IntestiCult™ Organoid Growth medium (Human)	(Resende et al., 2020)
Duodenum Jejunum Ileum Colon	Porcine epidemic diarrhea virus infection	Cell dissociation reagent	IntestiCult™ Organoid Growth medium (Human)	(Li et al., 2019a)
	Antiviral Protection	Cell dissociation reagent	IntestiCult™ Organoid Growth medium (Human)	(Li et al., 2019b)
Duodenum Jejunum Ileum (small intestine)	ETEC-host interaction (2D monolayers)	30 mM EDTA, 1.5 mM DTT, 6 µM ROCK inhibitor Y-27632, 30 min, on ice, on an orbital shaker	Matrigel + Growth factor mix (5.5 µg/mL rh R-spondin, 1.65 µg/mL rh Noggin, 1.65 µg/mL rh Wnt3a, 825 ng/mL rh EGF, 8.25 µM A83-01, 50 µM SB202190, 16.5 mM nicotinamide, 165 nM Gastrin, 165 µM Y-27632, 8.25 µM LY2157299, 41 µM CHIR99021). **Medium 1:** IESC medium *(Advanced DMEM/Nutrient mixture F-12, 1X N-2 supplement, 1X B-27 Supplement, 10 mM HEPES, 1% Glutamax and 1% P/S)* supplemented with 500 ng/mL R-spondin, 100 ng/mL Noggin, 100 ng/mL Wnt3a, 50 ng/mL EGF, 0.5 µM A83-01, 10 µM SB202190, 10 mM nicotinamide, 10 nM Gastrin, 10 µM Y-27632, 0.5 µM LY2157299 and 2.5 µM CHIR99021. **Medium 2:** L-WRN-conditioned IESC medium supplemented with EGF, A83-01, SB202190, nicotinamide, Gastrin, Y-27632, LY2157299 and CHIR99021. **Medium 3:** IntestiCult™ Organoid Growth medium (Human)	(Vermeire et al., 2021)
	Porcine deltacoronavirus (PDCoV) infection		Porcine Intestinal Proliferation Medium (PIPM) (commercial medium)	(Luo et al., 2020)
	Bile acids and porcine coronavirus diarrhea	Cell Dissociation Reagent,20 min, on rocking plateform	IntestiCult™ Organoid Growth medium (Human)	(Yang et al., 2022)
	Porcine deltacoronavirus (PDCoV) infection	Cell Dissociation Reagent	IntestiCult™ Organoid Growth medium (Human)	(Yin et al., 2020)
Ileum Colon	Location memory	EDTA, 30 min, on ice, on rocking plateform	Advanced DMEM/F12, 2 mM GlutaMAX, 10 mM HEPES, 50 % L-WRN CM, gastrin 15 nM, nicotinamide 10mM, NAC 1.25 mM, rhEGF 50 ng/mL, MAPK inhibitor SB20219010 mM, A83-01 600nM. Y-27632 10 mM (24 h after crypt isolation and passaging)	(Barnett et al., 2021)

CM: conditioned medium, **DMEM:** Dulbecco's modified Eagle's medium, **DTT:** dithiothreitol, **EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid, **EGF:** epidermal growth factor, **FBS:** fetal bovine serum, **HEPES:** 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, **L-WRN:** L cell line engineered to secrete Wnt3a, R-spondin 3 and Noggin, **MAPK:** mitogen-activated protein kinase, **NAC:** N-acetyl cysteine, **rh:** recombinant human, **rm:** recombinant mouse, **ROCK:** Rho-associated kinase. Antibiotics and antifungals added in the growth medium are not presented.

II.C. Cycle de culture des organoïdes intestinaux

Une fois ensemencées dans le Matrigel® et en présence du milieu de culture mimant l'environnement des cryptes épithéliales, des organoïdes sont obtenus soit après la fermeture de cryptes épithéliales isolées soit après la prolifération de cellules souches isolées (***Figure 34 et Figure 35***). Le milieu de culture est remplacé tous les 2-3 jours. Un **passage** est réalisé 5 à 10 jours après ensemencement pour multiplier la culture. Le passage est réalisé par dissociation des organoïdes en fragments ou en cellules isolées suivi de leur ensemencement dans le Matrigel® (*Beaumont et al., 2021a*). Ces passages peuvent théoriquement être répétés des dizaines de fois. Par exemple, des organoïdes de porc ont été cultivés pendant 17 passages, correspondant à 12 semaines (*van der Hee et al., 2020*). Les organoïdes intestinaux peuvent être **cryoconservés** à long terme dans de l'azote liquide grâce à un milieu de congélation composé de sérum de veaux fœtal (SVF), de diméthylsulfoxyde (DMSO), et parfois d'un inhibiteur des ROCK (Y27632) (*Beaumont et al., 2021a*). La congélation permet de constituer des **biobanques** et de réaliser un grand nombre d'expériences à partir d'une seule lignée d'organoïdes.

Pour des raisons pratiques, la mise en culture des cellules souches épithéliales intestinales peut être dissociée temporellement de leur isolement. En effet, il est possible de cultiver des organoïdes à partir de tissus intestinaux cryoconservés (*Tsai et al., 2018*). Il est aussi possible d'obtenir des organoïdes à partir de **cryptes congelées** (*Khalil et al., 2016*). Cependant, cette technique n'a pas été décrite en détail, en particulier chez le porc. La cryoconservation des tissus ou des cryptes permet de constituer un grand stock de cellules souches à partir d'un seul animal. Cette technique permet aussi de collecter simultanément les cellules souches intestinales de plusieurs animaux sans qu'il soit nécessaire de démarrer immédiatement la culture de toutes les lignées d'organoïdes.

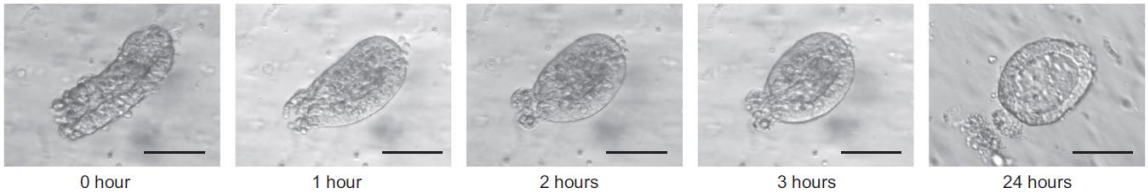


FIGURE 34 : EVOLUTION D'UNE CRYPTE INTESTINALE DE COLON HUMAIN EN CULTURE
D'après Almeqdadi et al. (2019).

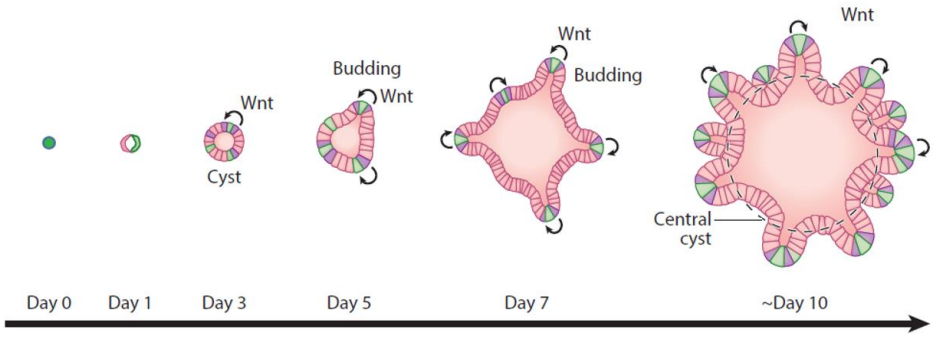


FIGURE 35 : FORMATION *IN VITRO* D'UN ORGANOÏDE D'INTESTIN A PARTIR D'UNE CELLULE SOUCHE ISOLEE
Les cellules souches intestinales (vert) prolifèrent, se divisent et forment des structures sphériques (« Cyst ») pendant les premiers jours de culture. Par la suite, la formation de bourgeons (« Budding ») est observée entrainant une structure plus complexe et multi-lobulée. D'après Date and Sato (2015).

En résumé

Le principe de la culture des organoïdes intestinaux repose sur la **reproduction *in vitro* de l'environnement des cellules souches**. Les **cellules souches** peuvent être issues de cellules embryonnaires ou induites par reprogrammation ou isolées de cryptes intestinales mais seule cette dernière technique a été développée chez le porc. L'utilisation d'une **matrice extracellulaire** est un facteur clé de la culture des organoïdes intestinaux en combinaison avec un **milieu de culture ciblant les principales voies régulant l'équilibre prolifération/différenciation dans l'épithélium** intestinal (Wnt, BMP, EGF, Notch). Les milieux de cultures développés initialement chez l'homme et la souris ont été transposés avec succès chez le porc. La possibilité d'utiliser des **cellules souches épithéliales intestinales congelées** pour cultiver des organoïdes est une opportunité importante pour réduire les prélèvements sur les animaux vivants mais cette technique n'a pas été décrite en détail chez le porc.

III. Phénotype des organoïdes intestinaux

III.A. Architecture et composition cellulaire des organoïdes intestinaux cultivés en 3 dimensions

Après leur mise en culture, les cellules souches se divisent et s'auto-organisent pour former des **structures sphériques** (cystes) constituées essentiellement de cellules souches et progénitrices (***Figure 35***) (*Date and Sato, 2015; Merker et al., 2016*). Les organoïdes sont formés d'une seule couche de cellules épithéliales organisées autour d'une lumière (***Figure 35 et Figure 36 A***) (*Sato et al., 2009*). Les organoïdes peuvent au cours de leur maturation *in vitro* former des **structures bourgeonnantes** vers l'extérieur mimant les cryptes épithéliales (***Figure 35***). Ces structures non sphériques sont généralement considérées plus différenciées mais ne sont pas observées à la même fréquence dans tous les segments digestifs (*exemple :* moins fréquentes dans le côlon). A maturité, les organoïdes intestinaux forment des structures complexes contenant des cellules souches localisées à la base des bourgeons, reflétant l'organisation observée *in vivo* (***Figure 36 B et C***) (*Sato et al., 2009; Date and Sato, 2015*). Ces cellules souches peuvent donner naissance aux **différents types de cellules épithéliales différenciées** (entérocytes, cellules en gobelet, cellules entéroendocrines et cellules de Paneth) qui sont toutes retrouvées au niveau des organoïdes (*Sato et al., 2009*). Les cellules de Paneth sont présentes à la base des bourgeonnements des organoïdes d'intestin grêle et permettraient de fournir un signal endogène d'activation de la voie Wnt aux cellules souches. Les autres cellules épithéliales différenciées se trouvent principalement dans les zones bordant la lumière des organoïdes. Les organoïdes intestinaux reproduisent donc *in vitro* les principales caractéristiques architecturales ainsi que la composition cellulaire de l'épithélium intestinal (*Costa and Ahluwalia, 2019; Beaumont et al., 2021a*). Chez le porc, les organoïdes intestinaux sont organisés dans l'espace de la même manière et sont également constitués de tous les types de cellules épithéliales intestinales (***Figure 37***) (*Gonzalez et al., 2013; Derricott et al., 2019; Beaumont et al., 2021a*).

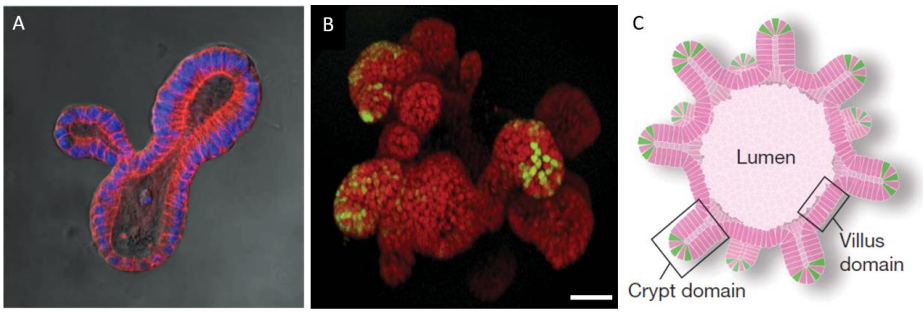


FIGURE 36 : CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DES ORGANOÏDES INTESTINAUX
(A) Observation d'organoïdes en microscopie confocale. Le marquage E-cadhérine (rouge) montre que les organoïdes sont constitués d'une monocouche de cellules jointives. Les noyaux sont marqués en bleu. **(B) Observation en microscopie confocale d'un organoïde intestinal murin reconstruit en 3 dimensions.** Les cellules souches (vertes) sont localisées à l'extrémité des domaines de type crypte. Les noyaux des cellules sont marqués en rouge. **(C) Représentation schématique d'un organoïde.** Un organoïde est constitué d'une lumière centrale tapissée d'un épithélium de type villosité (cellules différenciées) et de domaines de type crypte. Adapté de Sato et al. (2009).

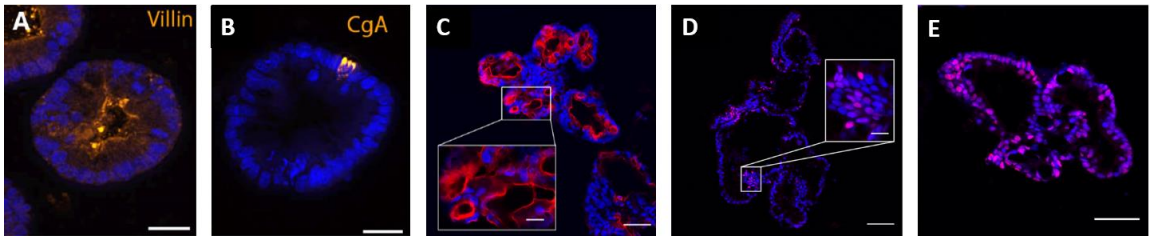


FIGURE 37 : TYPES CELLULAIRES PRESENTS *IN VITRO* DANS LES ORGANOÏDES INTESTINAUX DE PORC
(A) Organoïdes de côlon marqués pour la villine (orange), indiquant le pôle apical des cellules absorbantes. **(B)** Organoïdes de côlon marqués pour la chromogranine A (CgA, orange) exprimée par les cellules entéroendocrines. **(C)** Organoïdes de jéjunum marqués pour la mucine 2 (rouge) indiquant la sécrétion de mucus. **(D)** Organoïdes de jéjunum marqués pour SOX9, marqueur des cellules souches. **(E)** Organoïdes de jéjunum marqués pour PCNA, marqueur des cellules prolifératives. A-E : l'ADN (noyaux) est coloré en bleu. Adapté de Gonzalez et al. (2013) et Beaumont et al. (2021a).

III.B. Maintien du phénotype du tissu intestinal d'origine dans les organoïdes, stabilité et variabilité inter-individuelle

L'objectif de la culture d'organoïdes d'intestin est **de reproduire fidèlement le phénotype des cellules épithéliales d'origine**. Une étude chez le porc a montré qu'environ 80 % des gènes spécifiquement exprimés dans les tissus jéjunaux sont également exprimés dans les organoïdes de jéjunum alors que seuls 32 % de ces gènes sont exprimés par la lignée cellulaire porcine IPEC-J2 (*van der Hee et al., 2020*). Les gènes exprimés en commun entre le jéjunum *in vivo* et les organoïdes mais pas dans les IPEC-J2 sont principalement impliqués dans des processus tels que la digestion, l'absorption ou l'immunité (*van der Hee et al., 2020*). Par exemple, les organoïdes d'intestin de porc expriment la mucine 2 (marqueur des cellules en gobelet) et des entérohormones (marqueurs des cellules entéroendocrines), contrairement aux IPEC-J2. Le modèle organoïdes maintien donc plus de caractéristiques du tissu que les lignées cellulaires, constituant ainsi un meilleur modèle d'étude de l'épithélium intestinal porcin. Les gènes exprimés par les tissus et pas par les organoïdes concernent essentiellement les cellules non

épithéliales qui ne sont pas présentes dans les organoïdes. De plus, il existe des gènes exprimés uniquement dans les organoïdes de jéjunum et pas dans le tissu d'origine (*van der Hee et al., 2020*). Ces gènes sont impliqués dans des fonctions moléculaires et cellulaires reflétant probablement les interactions avec la MEC et l'auto-organisation des organoïdes. Une autre étude chez le porc a décrit que les gènes marqueurs des cellules souches (tels que *OLMF4* et *SOX9*) sont plus fortement exprimés dans les organoïdes d'iléon par rapport aux cryptes d'origine, alors que l'inverse est observé pour des gènes codant pour les marqueurs de types cellulaires différenciés (*SGLT1, APN*) (*Barnett et al., 2021*). Ces résultats indiquent que les organoïdes de porc garderaient un phénotype plutôt indifférencié et immature, pouvant s'expliquer par les conditions de culture utilisées dans cette étude pour favoriser la prolifération cellulaire afin de maintenir la culture des organoïdes. Il semble donc nécessaire d'optimiser les méthodes de culture des organoïdes de porcs pour favoriser la différenciation et mimer un épithélium mature.

La **stabilité du phénotype** des organoïdes au cours du temps et des passages est une caractéristique importante pour la reproductibilité des résultats. L'analyse de l'expression des gènes des organoïdes intestinaux de porcs montre une stabilité des profils d'expression au cours de la culture à long terme (*van der Hee et al., 2020; Barnett et al., 2021*). Par ailleurs, un des intérêts des organoïdes est la possibilité de reproduire *in vitro* la **variabilité génétique entre individus,** ce qui n'est pas possible avec les lignées cellulaires. En effet, les organoïdes intestinaux humains issus de différents donneurs ont un profil d'expression de gènes distincts (*Mohammadi et al., 2021*) (***Figure 38***). Cependant, cette caractéristique importante est peu prise en compte dans les études sur les organoïdes qui sont généralement menées sur seulement quelques d'individus. Chez le porc, la plupart des études sur les organoïdes ont aussi été réalisées sur des effectifs réduits (n = 2-3) (***Tableau 3***). Une étude menée sur trois porc a néanmoins montré que des différences interindividuelles persistent également au cours du temps et des passages (*van der Hee et al., 2020*). Enfin, il a été montré que les organoïdes intestinaux issus de patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin conservent certaines des caractéristiques liées à la maladie en lien avec le maintien de profils de méthylation de l'ADN (*Dotti et al., 2017; Howell et al., 2018*). La stabilité de **marques épigénétiques** dans les cellules souches pourrait donc jouer un rôle important dans la reproduction dans les organoïdes de caractéristiques observées dans les cellules d'origine.

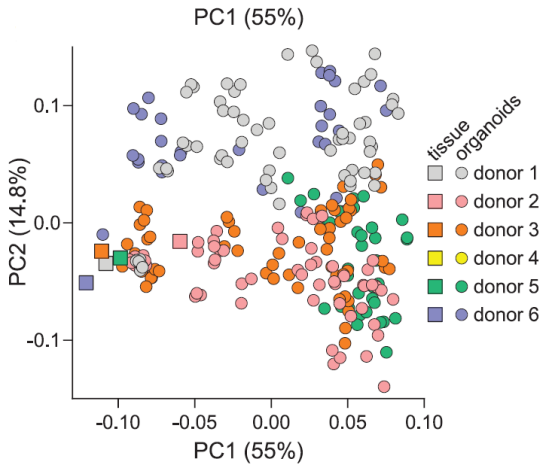


FIGURE 38 : PROFIL D'EXPRESSION DES GENES DANS DES ORGANOÏDES DE COLON HUMAIN ET DANS LES TISSUS D'ORIGINE

Analyse en composante principale du profil d'expression de gènes dans des organoïdes de côlon humain (représentés par des ronds) et dans les tissus d'origine (représentés par des carrés). Les couleurs représentent les donneurs. Une expression de gène distincte est observée en fonction des donneurs dans les organoïdes. D'après Mohammadi et al. (2021).

III.C. Maintien de l'identité du segment digestif dans les organoïdes

Un des intérêts majeurs des organoïdes est de pouvoir générer des cultures de cellules épithéliales à partir de cellules souches issues de tous les segments du tractus gastro-intestinal. Cette approche n'est pas possible avec les lignées cellulaires qui ne sont pas disponibles pour tous les segments digestifs, en particulier chez le porc. La disponibilité de ces organoïdes issus de chaque segment permet de comparer les effets de traitements en fonction du segment intestinal ou d'identifier le tropisme régional d'un pathogène. La composition du milieu de culture peut également varier en fonction du segment intestinal d'origine (*Date and Sato, 2015; Merker et al., 2016*). Par exemple, chez la souris il est nécessaire d'utiliser un milieu de culture contenant Wnt3a pour cultiver des organoïdes de côlon alors que ce n'est pas nécessaire pour obtenir les organoïdes d'intestin grêle. Cependant, la plupart des études utilisent le même milieu pour cultiver des organoïdes de différents segments, notamment pour les organoïdes porcins (***Tableau 3***).

Une **nomenclature** spécifique aux organoïdes intestinaux issus de différents segments digestifs a été proposée en 2012 par Stelzner et al., (2012). Les termes « entérosphères » et « colonosphères » correspondent à des organoïdes sphériques issus de l'intestin grêle ou du côlon, respectivement. Les termes « entéroïdes » et « colonoïdes » désignent des structures multi-lobulées issues d'entérosphères ou de colonosphères par la formation de cryptes bourgeonnantes. Cependant, il n'existe pas réellement de consensus sur l'utilisation de ces termes. Dans cette thèse, le choix a été fait d'utiliser le terme « organoïde » en précisant le segment digestif concerné, l'espèce et le stade de développement de l'animal dont sont issues les cellules souches (*exemple :* « organoïdes de jéjunum de porcelets allaités »).

Globalement, un profil d'expression de gènes spécifique du segment digestif est observé à la fois dans les tissus d'origine *in vivo* et dans les organoïdes *in vitro* (*Middendorp et al., 2014; VanDussen et al., 2015; Kraiczy et al., 2019; Kayisoglu et al., 2021b*) (***Figure 39***). Cependant, pour chaque segment intestinal, le profil d'expression de gènes dans les organoïdes est distinct de celui des tissus (***Figure 39***) (*Kraiczy et al., 2019*). Les cellules épithéliales intestinales possèdent un profil de **méthylation de l'ADN**, impliqué dans la régulation de l'expression des gènes, spécifique au segment intestinal (*Kraiczy et al., 2019*). Les organoïdes maintiennent cette signature de méthylation de l'ADN suggérant que la méthylation de l'ADN spécifique au segment ne dépend pas des stimuli environnementaux (*Kraiczy et al., 2019*). Cette persistance de marques épigénétiques pourrait expliquer le maintien de certaines caractéristiques liées au segment digestif dans les organoïdes.

Middendorp et al. (2014) ont montré qu'en moyenne 75 % des gènes spécifiquement exprimés au niveau des cryptes d'un segment intestinal murin donné (duodénum, jéjunum, iléon) sont également spécifiquement exprimés au niveau des organoïdes dérivés du même segment intestinal. Kraiczy et al. (2019) ont montré que seulement 56 % des différences d'expressions de gènes observées *in vivo* entre les cellules épithéliales issues d'iléon et de côlon humain sont conservées dans les organoïdes, avec seulement 2 % d'entre eux présentant une expression opposée. Dans certains cas, la différenciation des organoïdes est nécessaire pour reproduire l'expression de certains gènes dans les organoïdes, tels que l'expression de gènes codant pour des enzymes digestives spécifiques d'un segment digestif (*exemple :* sucrase-isomaltase) (*Middendorp et al., 2014; Zietek et al., 2020*). Des profils d'expression de gènes de l'immunité innée spécifique du segment digestif sont également observés dans les organoïdes (*exemple :* TLR) (***Figure 40***) (*Kayisoglu et al., 2021b*). Ces observations sont faites sur des organoïdes fœtaux et adultes ce qui démontre que l'identité régionale de ces gènes immunitaires est définie par le développement et non par l'environnement postnatal des cellules intestinales.

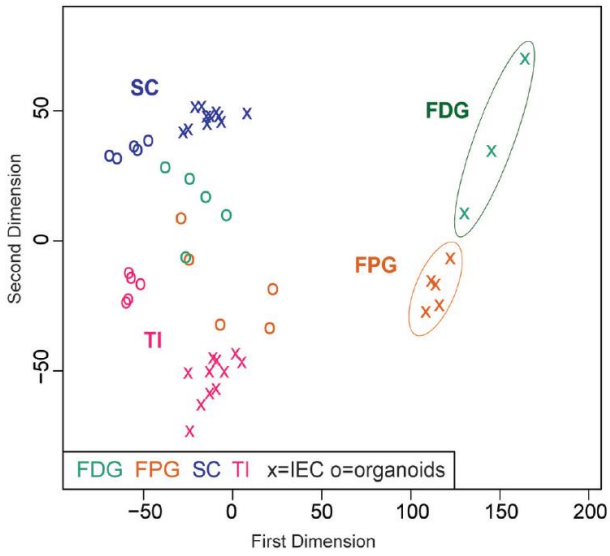


FIGURE 39 : PROFIL D'EXPRESSION DES GENES DANS DES ORGANOÏDES D'INTESTIN GRELE ET DE COLON ET DANS LES CELLULES EPITHELIALES D'ORIGINE ISSUES DE TISSUS ADULTES OU FŒTAUX

Analyse en composante principale du profil d'expression de gènes dans des cellules épithéliales isolées (IEC, représentées par des croix) et dans des organoïdes (représentés par des ronds) issus de côlon sigmoïde adulte (SC, bleu), d'iléon terminal adulte (TI, rose), d'intestin fœtal proximal (FPG, orange) ou d'intestin fœtal distal (FDG, vert). L'expression des gènes est distincte entre les cellules épithéliales et les organoïdes et entre le stade fœtal et adulte. D'après Kraiczy et al. (2019).

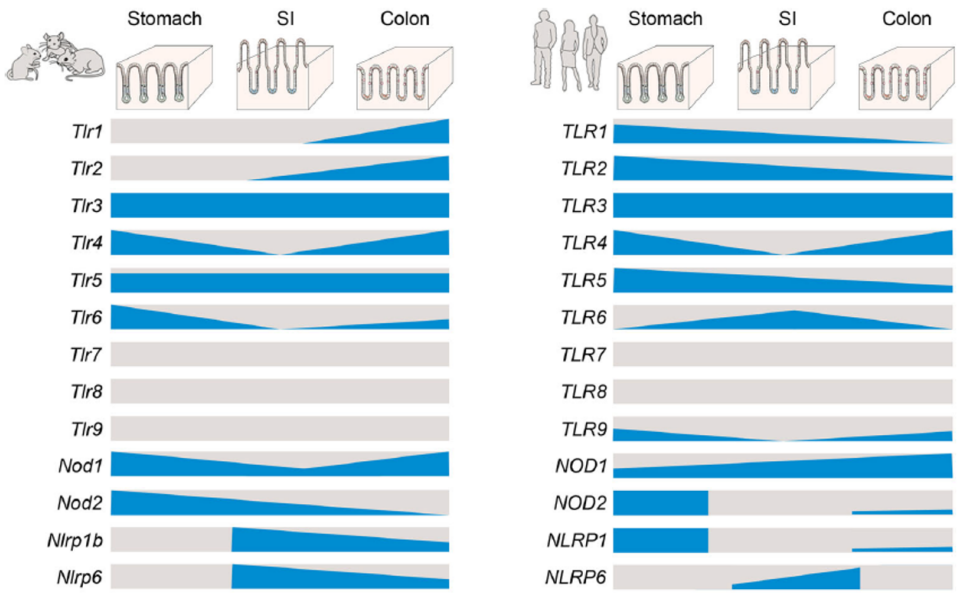


FIGURE 40 : EXPRESSION RELATIVE DES ARNM DE GENES LIES A L'IMMUNITE DANS DES ORGANOÏDES ISSUS DE PLUSIEURS SEGMENTS DU TRACTUS GASTRO-INTESTINAL MURIN (A GAUCHE) ET HUMAIN (A DROITE)

L'expression des gènes des récepteurs de l'immunité innée dans les organoïdes est spécifique du segment du tractus gastro-intestinal. L'expression spécifique liée au segment digestif de ces gènes peut être différentes entre les espèces. D'après Kayisoglu et al. (2021a).

Ces différences régionales d'expression de gènes dans les organoïdes sont associées à des **différences fonctionnelles liées au segment digestif d'origine**. Par exemple, les organoïdes de côlon murin sont sensibles à la stimulation par des lipopolysaccharides (LPS) contrairement aux organoïdes de jéjunum (*Kayisoglu et al., 2021b*). Cette sensibilité accrue au LPS dans les organoïdes de côlon est associée à une expression plus élevée des gènes impliqués dans la réponse au LPS (*TLR4*, *CD14*, *LBP*) (*Kayisoglu et al., 2021b*). En revanche, aucune réponse n'est observée en réponse à la stimulation par le LPS dans les organoïdes humains, en lien avec l'absence de l'expression des gènes de protéines clés de la voie du TLR4 (*CD14*, *LBP*, *MD2*) (*Kayisoglu et al., 2021b*). Cette étude montre donc que la sensibilité des organoïdes au LPS varie en fonction du segment digestif et de l'espèce.

Chez le porc, une étude a montré que les gènes impliqués dans les fonctions de digestion et de transport des nutriments (tels que *FABP1* et *FABP2*) sont spécifiquement exprimés dans les organoïdes de jéjunum alors que les organoïdes d'iléon expriment spécifiquement des gènes associés à l'immunité innée (*exemple :* réponse interféron de type I) (*van der Hee et al., 2020*). Une autre étude chez le porc a également montré une corrélation entre l'expression de gènes dans les tissus de l'iléon et du côlon avec leurs organoïdes respectifs indiquant que les cellules souches porcines conservent en partie leur identité liée au segment lors de la culture (*Barnett et al., 2021*). Ainsi, les organoïdes porcins ont pu être utilisés pour étudier le tropisme des pathogènes entériques en fonction du segment digestif (*Beaumont et al., 2021a*). Par exemple, la sensibilité à l'infection par les virus PEDV et PDCoV est plus élevée dans les organoïdes d'intestin grêle de porc que dans les organoïdes de côlon (*Li et al., 2019a; Yin et al., 2020*).

III.D. Maintien de l'identité du stade de développement dans les organoïdes intestinaux

Les organoïdes intestinaux peuvent être issus de cellules souches épithéliales isolées de tissus intestinaux collectés à divers stades de développement. Cette possibilité ouvre de nombreuses applications pour tester les effets de traitements ciblant un stade spécifique de développement de l'intestin. Cependant, pour que cette approche soit robuste, il est nécessaire que le phénotype lié au stade de développement d'origine soit maintenu de manière stable dans les organoïdes.

Une étude a montré que des organoïdes humains dérivées de **cellules souches fœtales ou adultes** conservent *in vitro* des profils d'expression des gènes spécifiques du stade développement d'origine (*Senger et al., 2018*) (***Figure 41***). En effet les gènes associés à la réponse immunitaire innée, à la maturation de l'épithélium intestinal et à la fonction de barrière intestinale sont moins exprimés dans les organoïdes fœtaux par rapport aux organoïdes adultes, comme observé *in vivo* (*Senger et al., 2018*). De plus, des analyses d'expression de gènes pendant 15 passages ont montré une stabilité du phénotype des organoïdes fœtaux au cours de la culture (*Senger et al., 2018*).

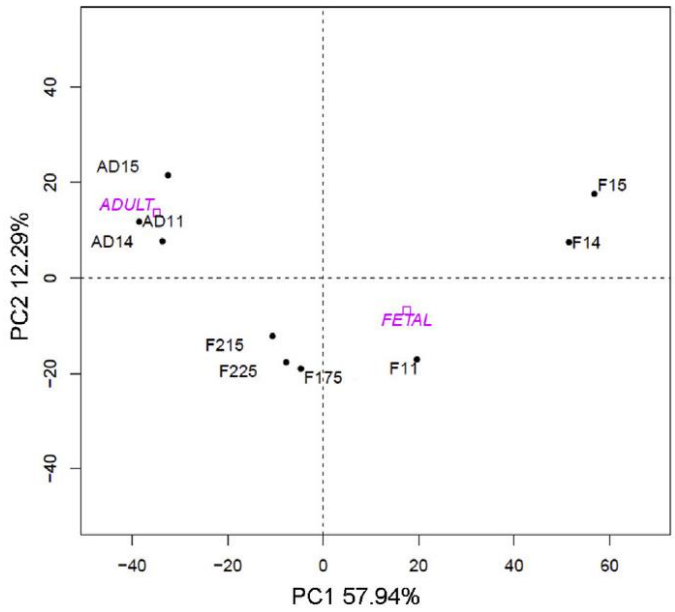


FIGURE 41 : PROFIL D'EXPRESSION DE GENES DANS DES ORGANOÏDES D'INTESTIN GRELE HUMAIN FŒTAUX OU ADULTES

Analyse en composante principale montrant le regroupement des échantillons d'organoïdes issus d'intestin adulte ou fœtal sur la base de leur profil d'expression de gènes après plusieurs passages (> 6). Pour les organoïdes issus de fœtus, le chiffre indique la durée de gestation en semaine. Pour les organoïdes issus de tissus adultes, le chiffre indique l'identifiant du patient. Les carrés violets indiquent le barycentre de chaque groupe. D'après Senger et al. (2018).

Au contraire, d'autres études ont démontré que les organoïdes dérivées de tissus fœtaux subissent une **maturation *in vitro*** (*Kraiczy et al., 2019; Navis et al., 2019*). Navis et al. (2019) ont montré que les organoïdes murins dérivées de tissus fœtaux maturent *in vitro* et, après un mois de culture, ressemblent aux organoïdes dérivées de tissus adultes. En effet, bien que le milieu de culture ne soit pas modifié, les organoïdes intestinaux fœtaux de souris perdent progressivement l'expression des marqueurs de l'épithélium intestinal néonatal (*exemple :* Argininosuccinate Synthase 1) et expriment les marqueurs de l'épithélium intestinal adulte (*exemple :* sucrase isomaltase), reflétant *in vitro* les modifications observées *in vivo* lors de la transition alimentaire du sevrage (***Figure 42***). Les niveaux d'expression des marqueurs de types cellulaires de l'épithélium intestinal (entérocytes, cellules entéroendocrines et cellules en gobelet) sont stables au cours de la culture des organoïdes fœtaux, indiquant que la transition des caractéristiques fœtales aux caractéristiques adultes *in vitro* est intrinsèquement programmé et ne résulte pas d'une modification de la composition cellulaire lors de la culture prolongée (*Navis et al., 2019*). Une autre étude a également montré une différence transcriptionnelle entre des organoïdes fœtaux humains à un passage précoce (P1) et à un passage tardif (P7) dont les profils transcriptionnels semblaient plus similaires à ceux de l'épithélium intestinal adulte (donc plus mature) (*Kraiczy et al., 2019*). A l'inverse, cette maturation *in vitro* n'est pas observée pour les organoïdes issus de tissus intestinaux obtenus après la naissance (*Kraiczy et al., 2019; Navis et al., 2019*).

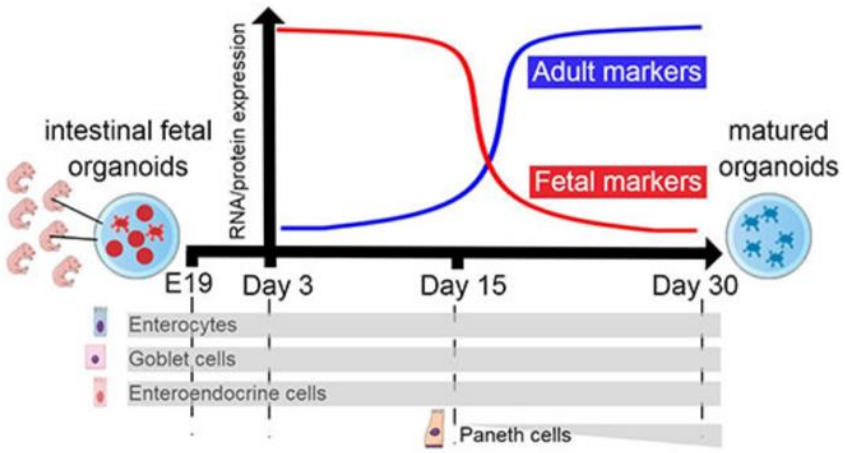


FIGURE 42 : MATURATION DE L'EPITHELIUM INTESTINAL *IN VITRO*
Les organoïdes dérivés de cellules épithéliales intestinales fœtales de souris reproduisent *in vitro* la maturation de l'épithélium observée lors de la transition allaitement-sevrage. D'après Navis et al. (2019).

De plus, les cellules épithéliales de l'intestin fœtal présentent des **profils de méthylation de l'ADN** distincts des cellules intestinales adultes (*Kraiczy et al., 2019*). Ces différences sont conservées dans les organoïdes intestinaux dérivées de cellules souches fœtales et adultes, mimant leur tissu d'origine. Cependant, comme pour les profils transcriptomiques, les organoïdes fœtaux subissent des modifications dynamiques de la méthylation de l'ADN au cours du temps, et se rapprochent des profils de méthylations adultes (*Kraiczy et al., 2019*). Ces résultats mettent en évidence une plasticité épigénétique au cours du développement des organoïdes fœtaux. Ces résultats suggèrent que seuls les processus développementaux se déroulant *in utero* auraient lieu spontanément dans les organoïdes. Cette maturation *in vitro* reproduisant la maturation de l'épithélium intestinal *in vivo* suggère l'existence d'un programme de maturation intrinsèque à la cellule sans que ne soient nécessaires d'autres composants cellulaires ou issus de l'environnement luminal. Les organoïdes fœtaux pourraient donc être utilisés comme modèle pour l'étude du développement de l'épithélium intestinal.

Contrairement aux organoïdes fœtaux, peu d'études ont caractérisé le phénotype des organoïdes issus de différents stades du **développement post-natal**. Une étude chez le porcelet a montré que le profil d'expression lié à l'âge de gènes codant pour des enzymes digestives épithéliales (lactase, sucrase isomaltase, arginase 2) et du gène de la mucine 2 n'est pas maintenu dans les organoïdes de jéjunum dérivés de cellules souches épithéliales issues de porcelets de différents âges (de 10 jours avant la naissance à 35 jours après la naissance) (*Mohammad et al., 2020*) (***Figure 43***). Cependant, le maintien des altérations majeures de la fonction barrière de l'épithélium intestinal lors de la transition au sevrage chez le porcelet n'a pas été étudié.

Globalement, les organoïdes dérivés de cellules souches obtenues après la naissance ne semblent donc pas maintenir le phénotype de leur stade de développement d'origine ni maturer *in vitro* (*Kraiczy et al., 2019; Navis et al., 2019; Mohammad et al., 2020*). La programmation intrinsèque des cellules souches ne serait donc pas suffisante pour recréer la totalité du phénotype dépendant de l'âge. Des signaux externes issus du mésenchyme ou de l'environnement luminales des cellules *in vivo* semblent nécessaires pour reproduire le stade de développement post-natal dans les organoïdes. La co-culture avec des cellules de la *lamina propria*, ou la manipulation des milieux de culture avec l'inclusion du microbiote ou de produits dérivés du microbiote, pourrait être des solutions envisageables pour recréer une expression génique dépendante de l'âge.

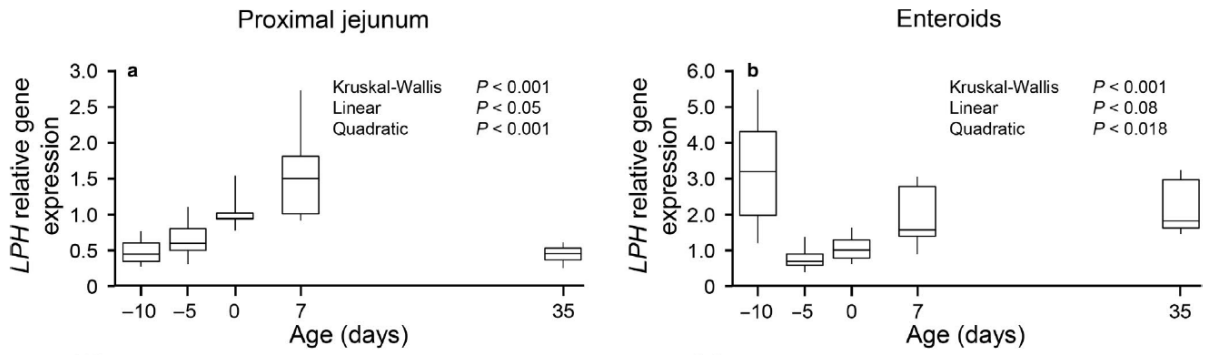


FIGURE 43 : EXPRESSION DU GENE DE LA LACTASE DANS LE JEJUNUM PORCIN ET DANS DES ORGANOÏDES D'INTESTIN GRELE ISSUS DE DIVERS STADES DE DEVELOPPEMENT

L'expression du gène de la lactase (LPH) a été mesurée dans le jéjunum de porc à divers stades de développement (10 et 5 jours avant la naissance, le jour de la naissance, 7 et 35 jours après la naissance) ainsi que dans des organoïdes dérivés des mêmes échantillons, après 2 passages. Le sevrage a eu lieu à 21 jours. Les organoïdes ne conservent pas les différences d'expression du gène de la lactase en fonction de l'âge des porcs. D'après Mohammad et al. (2020).

En résumé

Les organoïdes intestinaux reproduisent **l'architecture de l'épithélium** et sont constitués de **tous les types cellulaires présents *in vivo***. Le transcriptome des organoïdes est plus proche de celui des tissus *in vivo* que les lignées cellulaires mais des différences persistent, notamment en lien avec l'absence de cellules non-épithéliales. Le phénotype des organoïdes d'intestin semble globalement **stable au cours de la culture** et des passages. Le maintien des **différences inter-individuelles** dans les organoïdes est un intérêt majeur de ce modèle mais cette caractéristique a peu été prise en compte, en particulier chez le porc.

La signature d'expression de gènes spécifique à la **localisation dans l'intestin** est partiellement maintenue *in vitro* dans les organoïdes, indiquant que les cellules souches épithéliales sont intrinsèquement programmées pour maintenir une partie de leur identité liée au segment intestinal sans que les signaux externes spécifiques à la localisation provenant du mésenchyme ou de la lumière intestinale ne soient nécessaires. Les quelques résultats obtenus chez le porc semblent confirmer ces observations. De plus, d'importantes différences inter-espèces existent pour l'expression de gènes liée au segment digestif ainsi que pour leur maintien dans les organoïdes. Une caractérisation approfondie du maintien dans les organoïdes des caractéristiques liées au segment digestif est donc nécessaire chez le porc.

Les organoïdes intestinaux semblent maintenir des caractéristiques liées à leur **stade de développement** d'origine lorsqu'il s'agit de prélèvements fœtaux. Cependant, des données contradictoires ont été obtenues quant à la stabilité *in vitro* de ce phénotype lié au stade de développement. Par ailleurs, les organoïdes issus de tissus collectés après la naissance ne semblent pas conserver le phénotype lié au stade de développement. Peu d'études ont examiné cette question chez le porc pour lequel il serait important de disposer d'un **modèle mimant les caractéristiques de l'épithélium intestinal avant et après sevrage**, notamment en lien avec la dysfonction de la fonction de barrière.

IV. Polarisation des cellules dans les organoïdes intestinaux

IV.A. Difficulté d'accès au pôle apical des cellules dans les organoïdes 3D

La visualisation de l'actine en microscopie confocale, majoritairement présente *in vivo* au niveau des microvillosités situées au pôle apical des cellules épithéliales intestinales, indique que les cellules épithéliales des organoïdes sont polarisées avec le pôle apical dirigé vers l'intérieur des organoïdes intestinaux (**organoïdes « apical-in »**) (***Figure 44 A***) (*Sato et al., 2009; Khalil et al., 2016; Derricott et al., 2019; Beaumont et al., 2021a*). Ces résultats sont confirmés par l'observation de microvillosités à l'intérieur des organoïdes en microscopie électronique à transmission (***Figure 44 B***) (*Sato et al., 2009*). Ainsi, le pôle apical des cellules des organoïdes n'est pas directement accessible et implique une exposition du pôle basal des cellules lorsque les traitements sont ajoutés dans le milieu de culture. Cette exposition basolatérale n'est pas physiologiquement pertinente pour l'étude de composés luminaux (nutriments, métabolites, toxines, micro-organismes) qui agissent sur les cellules au niveau du pôle apical *in vivo* (*Beaumont et al., 2021a*). Pour contourner cet inconvénient, plusieurs méthodes ont été développées.

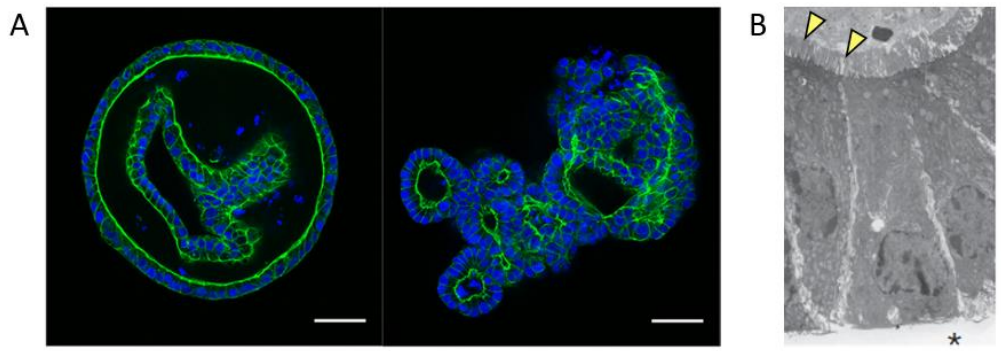


FIGURE 44 : POLARISATION DES CELLULES EPITHELIALES DANS LES ORGANOÏDES INTESTINAUX
(A) Analyse par microscopie confocale de la localisation de la bordure en brosse dans des organoïdes 3D de porc. L'actine (vert), localisée principalement dans les microvillosités apicales, est située vers l'intérieur de l'organoïde. Les noyaux cellulaires ont été marqués en bleu. D'après Holthaus et al. (2021). **(B) Microscopie électronique à transmission** d'un organoïde humain montrant la présence de microvillosités (flèches jaune) à l'intérieur de l'organoïde. * : indique la localisation du Matrigel®. D'après Sato et al. (2009).

IV.B. Méthodes d'accès au pôle apical des cellules épithéliales d'organoïdes

Les méthodes utilisées pour avoir accès au pôle apical des cellules intestinales des organoïdes sont présentées sur la ***Figure 45***.

La **micro-injection** permet d'injecter directement un traitement (*exemple :* micro-organismes) à l'intérieur de l'organoïde (***Figure 45*** ①) (*Wilson et al., 2015; Heo et al., 2018*). Cependant cette technique nécessite d'avoir des organoïdes avec une lumière visible, souvent réduite dans les organoïdes différenciés (*Beaumont et al., 2021a*). La micro-injection est une technique difficile qui requiert beaucoup de précision, de temps (induisant un faible rendement d'organoïdes injectés) et du personnel qualifié. Cette technique soulève également des inquiétudes quant à la reproductibilité

notamment due à la taille hétérogène des organoïdes, au volume injecté par organoïde et à la possibilité de fuites dans le milieu (*Beaumont et al., 2021a*). Aucune étude utilisant la micro-injection dans des organoïdes intestinaux de porc n'a été publiée.

La dissociation mécanique des organoïdes pour obtenir des **fragments d'organoïdes** permet leur incubation avec des composés luminaux, généralement des micro-organismes (***Figure 45*** ②) (*Saxena et al., 2015*). Cette technique permet l'exposition du pôle apical des cellules lors de l'incubation. Les fragments d'organoïdes incubés avec les micro-organismes sont ensuite remis en culture dans du Matrigel® et des micro-organismes peuvent ainsi se trouver dans la lumière. Une étude chez le porc a utilisé cette technique pour l'étude de l'infection par la bactérie *Salmonella Typhimurium* et par le parasite protozoaire *Toxoplasma gondii* (*Derricott et al., 2019*). Cependant, le pôle basolatéral des cellules est également exposé aux traitements lorsque les organoïdes sont sous forme de fragments.

Co et al. (2019) ont développés une méthode permettant d'inverser la polarité des cellules épithéliales d'organoïdes intestinaux humains. Le retrait de la MEC, par la culture en suspension des organoïdes, induit une inversion de la polarité des cellules et la perte de la lumière de l'organoïde (**organoïdes « apical-out »**) (***Figure 45*** ③). Cette méthode a été appliquée pour inverser la polarité d'organoïdes de jéjunum et de côlon de porc pour faciliter les études d'interaction des cellules intestinales avec les composés luminaux (*Li et al., 2020; Beaumont et al., 2021a*). Cependant la réversion de la polarité ne s'effectue pas dans tous les organoïdes à la même vitesse, induisant donc une forte hétérogénéité phénotypique. De plus, la viabilité des organoïdes apical-out cultivés en suspension semble limitée (*Beaumont et al., 2021a*).

Enfin, la méthode la plus utilisée aujourd'hui est la **culture des cellules d'organoïdes en monocouche en 2 dimensions (2D)** permettant de recréer l'interface formée par l'épithélium *in vivo*. Pour cela, les organoïdes sont dissociés en cellules isolées ou en fragments avant ensemencement dans des puits d'une plaque de culture (***Figure 45*** ④) ou dans des inserts de culture (***Figure 45*** ⑤). Les puits ou les inserts sont préalablement recouverts (étape de « coating ») avec une fine couche de MEC (*exemple :* Matrigel® ou collagène) permettant de créer un support pour l'attachement des cellules par leur pôle basal et la croissance des cellules en 2 dimensions tout en évitant leur croissance en 3D (*Dutton et al., 2019; Beaumont et al., 2021a*). Plusieurs protocoles ont récemment été établis pour cultiver des monocouches dérivées d'organoïdes intestinaux de porc mais il existe d'importantes variations dans les méthodes utilisées (***Tableau 4***). Les principales différences concernent la méthode de coating utilisée, la composition du milieu de culture et la densité de cellules ensemencées (très variable). En conséquence, l'obtention de monocouches confluentes est plus ou moins rapide en fonction des méthodes (entre 3 et 10 jours). Il est possible de favoriser la différenciation des monocouches de cellules épithéliales en réduisant les ligands de Wnt dans le milieu de culture (*Holthaus et al., 2021*), par l'ajout d'un inhibiteur des γ-sécrétase (DAPT) bloquant l'activité de la voie Notch (*Moon et al., 2014*) ou en procédant à une culture de type air-liquide interface (ALI) en retirant le milieu de culture apical (***Figure 45*** ⑤) (*Engevik et al., 2020*).

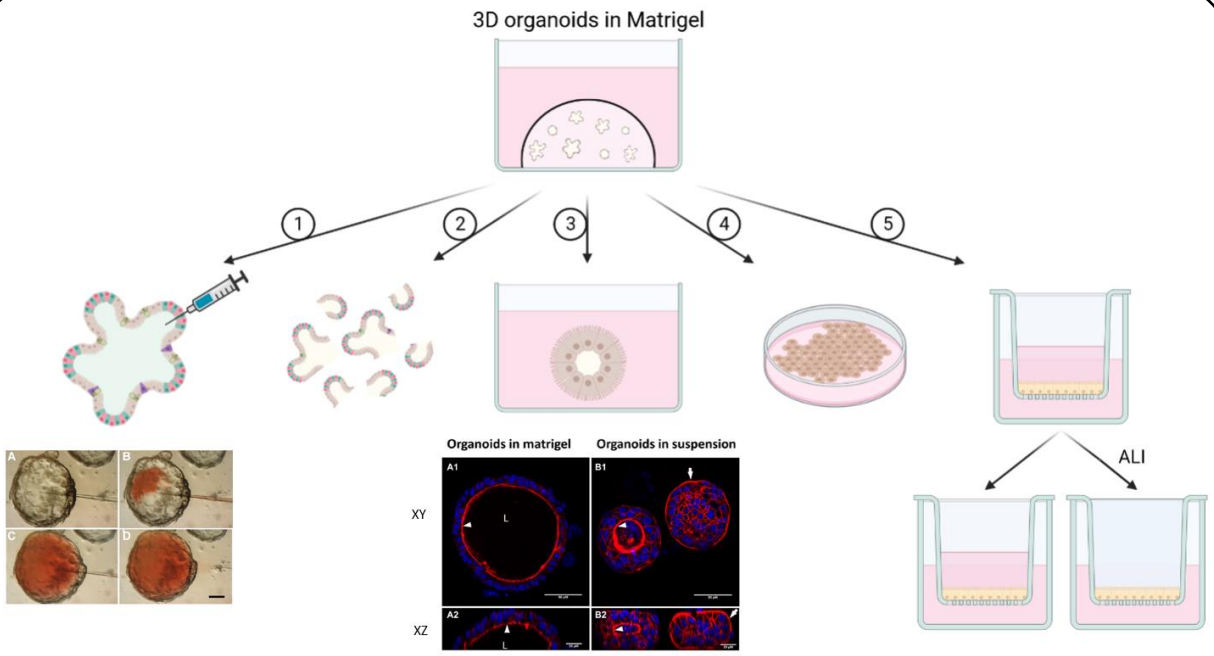


FIGURE 45 : METHODE D'ACCES AU POLE APICAL DES CELLULES EPITHELIALES A PARTIR DES ORGANOÏDES 3D
Il existe différentes techniques permettant de traiter spécifiquement le pôle apical des cellules épithéliales d'organoïdes intestinaux. ① La technique de **micro-injection** consiste à injecter directement le traitement dans la lumière de l'organoïde intestinal, permettant une exposition ciblée au côté apical des cellules. **A-D :** Micro-injection dans un organoïde de côlon de porc : suivi de la micro-injection au microscope et utilisant un colorant alimentaire. ② Les organoïdes sont dissociés mécaniquement afin d'exposer le pôle apical des cellules. ③ **Modèle d'organoïdes « apical-out » :** la culture en suspension (sans matrice) des organoïdes permet une inversion de la polarité des cellules et l'exposition du pôle apical. Les image de microscopie confocale montrent la polarité des cellules dans des organoïdes de côlon de porcelet cultivés dans du Matrigel® (**A1 et A2**) ou en suspension (**B1 et B2**). Le marquage de l'actine (rouge) montre l'inversion de la polarité épithéliale. Coloration des noyaux en bleu (DAPI). Les flèches indiquent le côté apical des cellules épithéliales, L : lumen. Les organoïdes sont dissociés en cellules isolées et ensemencées : ④ dans des puits d'une plaque de culture ; ou ⑤ dans des inserts de culture pour former des **monocouches de cellules épithéliales en 2D**. L'utilisation des inserts permet la séparation du compartiment apical et du compartiment basal et peut être utilisé pour cultiver les cellules en milieu liquide ou en interface air-liquide (ALI) par retrait du milieu de culture du compartiment apical. Adapté de Beaumont et al. (2021a) et Ma et al. (2022).

Les cellules épithéliales dérivées d'organoïdes intestinaux forment une monocouche de cellules polarisées permettant un accès direct au pôle apical des cellules (***Figure 46 A***) (Moon et al., 2014; van der Hee et al., 2018). Les différents types cellulaires de l'épithélium intestinal ainsi que des protéines de jonctions serrées sont également retrouvés au niveau des monocouches (***Figure 46 B et D***) *(VanDussen et al., 2015; Kozuka et al., 2017; Hoffmann et al., 2021*). Comme dans les organoïdes 3D, une régionalisation des cellules prolifératives et des cellules différenciées a été observée dans des monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de souris (*Dutton et al., 2019*). Cette régionalisation serait dépendante du type de MEC utilisé pour le coating des puits (Matrigel® ou collagène). Chez la souris et le porc les cellules épithéliales prolifératives se situent le long des bords de la monocouche en expansion sur une matrice de collagène, quand les tapis ne sont pas encore confluents (***Figure 46 C***) (*Dutton et al., 2019; Vermeire et al., 2021*).

La culture des cellules en monocouche en **inserts** permet un accès aux deux pôles des cellules (apical et basal). L'étude du transport de petites molécules fluorescentes (*exemple :* FITC-Dextran 4kDa) et la mesure de la TEER constituent des outils d'étude de la perméabilité épithéliale paracellulaire (*Beaumont et al., 2021a*). Les tapis cellulaires obtenu à partir des cellules épithéliales d'organoïdes

intestinaux de porc présentent une TEER croissante au cours du temps indiquant la formation progressive d'une barrière épithéliale intacte (***Figure 46 E***) (*van der Hee et al., 2018; Beaumont et al., 2021a; Holthaus et al., 2021*). Une étude a montré que les monocouches de cellules issues d'organoïdes de fœtus humains de début de gestation ont une perméabilité paracellulaire supérieure à celles issues d'organoïdes fœtaux de fin de gestation ou adulte (*Senger et al., 2018*). De la même manière, les cellules d'organoïdes fœtaux précoces ne répondent pas à une stimulation par *E. coli* inactivée par la chaleur, contrairement aux cellules issues de stades de développement plus tardifs (*Senger et al., 2018*). Ces résultats suggèrent que les monocouches de cellules d'organoïdes pourraient être utilisées pour reproduire les caractéristiques de la fonction de barrière liée au stade de développement des tissus d'origine.

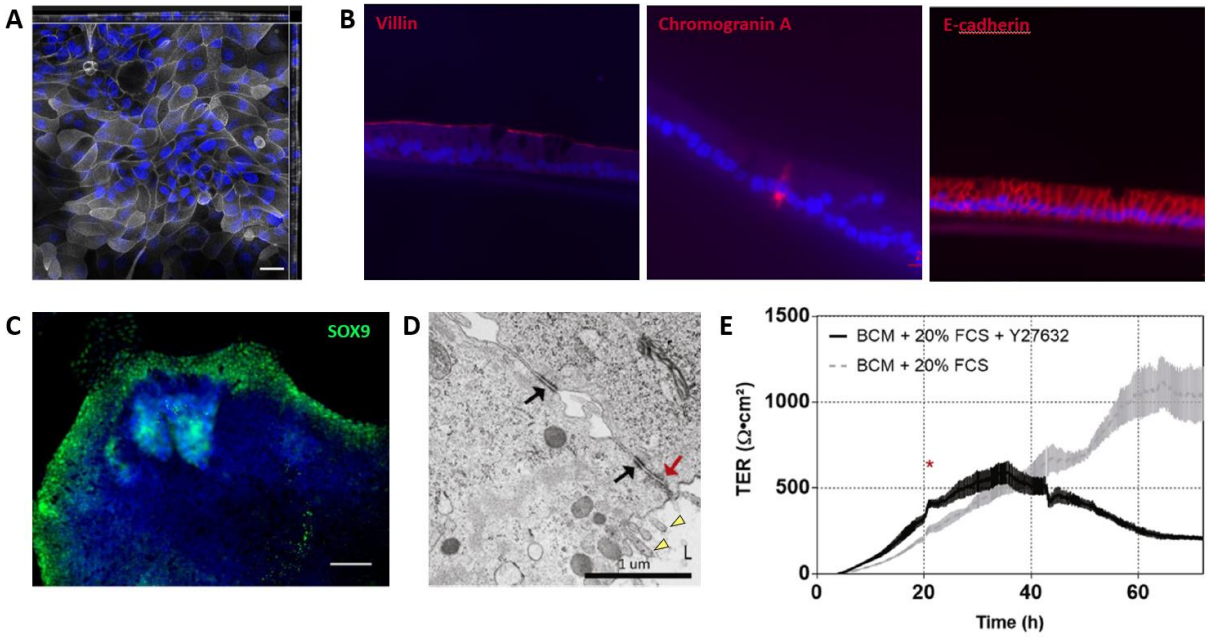


FIGURE 46 : CARACTERISATION DES MONOCOUCHES DE CELLULES EPITHELIALES DERIVEES D'ORGANOÏDES INTESTINAUX DE PORC

(A) Polarisation des cellules dans les monocouches. Image représentative en microscopie confocale d'une monocouche dérivée d'organoïdes de duodénum de porc montrant les noyaux (bleu) et l'actine (gris) localisée principalement au pôle apical des cellules (Holthaus et al., 2021) **(B) Marquage en microscopie confocale de différents types cellulaires.** Les monocouches dérivées d'organoïdes de jéjunum de porc permettent d'identifier les noyaux en bleu et la villine marqueur du pôle apical des entérocytes, la chromogranine A marqueur des cellules entéroendocrines et la E-cadhérine, une protéines des jonctions adhérentes en rouge (Hoffmann et al., 2021) **(C) Marquage des cellules souches.** Des monocouches non confluentes dérivées d'organoïdes de l'intestin grêle ont été marquées avec un anticorps anti-SOX9, facteur de transcription impliqué dans la prolifération des cellules souches. Les cellules souches sont localisées sur le bord du tapis cellulaire (Vermeire et al., 2021) **(D) Image de microscopie électronique à transmission d'une monocouche dérivée d'organoïdes de jéjunum.** Les cellules sont jointives entres elles par des jonctions serrées (flèche rouge), des jonctions d'adhérentes et des desmosomes (flèches noires). Des microvillosités sont également observées (flèche jaunes) (L= côté luminal) (van der Hee et al., 2018) **(E) Evolution de la TEER des monocouches dérivées d'organoïdes de jéjunum.** Les cellules forment des tapis cellulaire avec une TEER qui augmente au cours du temps et atteignant environ 1000 Ω.cm² après 3 jours de culture en l'absence de Y27632 (van der Hee et al., 2018).

La dysfonction de la barrière épithéliale peut également être induite dans les cellules d'organoïdes cultivées en 2D à l'aide de cytokines pro-inflammatoire (IFN-γ, le TNF-α, Interleukines) (*Bruewer et al., 2003; d'Aldebert et al., 2020; Jelinsky et al., 2023)*. Par exemple, une étude sur des monocouches de cellules épithéliales dérivées d'organoïdes de côlon humain a montré une diminution de la TEER dose-dépendante en réponse au traitement avec un cocktail de cytokines (IFN-γ, le TNF-α, IL1) au cours des premières 24 heures (*Jelinsky et al., 2023*). La diminution de la TEER était associée à une augmentation du flux de FITC-dextran indiquant une perte de la fonction barrière épithéliale.

Le ***Tableau 4*** récapitule l'ensemble des applications du modèle de monocouche de cellules épithéliales dérivées d'organoïdes intestinaux de porc. Ce modèle a été principalement utilisé pour la modélisation d'infections entériques (***Tableau 4***). Des monocouches épithéliales dérivées d'organoïdes ont été infectées avec succès par plusieurs virus (notamment le virus de la diarrhée épidémique porcine [PEDV] et le deltacoronavirus porcin [PDCoV]) (*Li et al., 2019a; Luo et al., 2020; Yin et al., 2020*), par les bactéries *Lawsonia intracellularis* et ETEC (*Resende et al., 2020; Vermeire et al., 2021*) et par le parasite protozoaire *Toxoplasma gondii* (*Holthaus et al., 2021*). Ce modèle est également utilisé pour l'étude du transport des nutriments du pôle apical vers le pôle basal des cellules épithéliales, indiquant que la capacité d'absorption des nutriments est fonctionnelle (*van der Hee et al., 2020*).

Le principal inconvénient du modèle des monocouches est la **perte de la structure 3D des organoïdes**. Pour contourner ce problème, les cellules d'organoïdes peuvent être ensemencées sur des supports micro-structurés reproduisant la **micro-architecture** des cryptes et des villosités (*Wang et al., 2017, 2018*). Des modèles de micro-ingénierie plus complexes utilisent des systèmes de micro-fluidique (organoïdes sur puce) pour reproduire les flux biologiques et le péristaltisme en plus de la micro-architecture, offrant ainsi des modèles d'intestin plus physiologiques (*Chen et al., 2017b; Kasendra et al., 2018; Nikolaev et al., 2020*). De plus, comme dans les organoïdes 3D, seules les cellules épithéliales sont présentes dans les modèles de monocouches de cellules d'organoïdes, ce qui ne reproduit pas la complexité cellulaire présente *in vivo* notamment avec la *lamina propria* et les cellules immunitaire (*Ma et al., 2022*). Chez l'homme, la culture en monocouche a été complexifié par la co-culture des cellules épithéliales dérivées d'organoïdes intestinaux avec des cellules immunitaires (*Noel et al., 2017*). L'ensemble de ces modèles avancés n'a pas encore été développé chez le porc.

En résumé

Le **pôle apical** des cellules épithéliales est orienté vers l'intérieur des organoïdes 3D et n'est donc pas facilement accessible pour étudier les effets de composés luminaux (nutriments, métabolites, micro-organismes). La méthode la plus utilisée et la plus robuste pour contourner cette difficulté est de cultiver des **monocouches de cellules d'organoïdes**. Ce format de culture permet d'accéder directement au pôle apical des cellules et d'étudier la **fonction de barrière et le transport de nutriments**. Les protocoles utilisés pour cultiver les cellules d'organoïdes d'intestin de porc en monocouches sont très variables. Une **harmonisation des méthodes** est donc nécessaire pour faciliter la comparaison entre les études. De plus, il n'existe pas de modèle standardisé de dysfonction de la barrière épithéliale dans le modèle des monocouches de cellules d'organoïdes de porc, notamment pour mimer les modifications induites par le sevrage.

TABLEAU 4 : DESCRIPTIONS DES ETUDES UTILISANT DES MONOCOUCHES DE CELLULES DERIVEES D'ORGANOÏDES INTESTINAUX DE PORC (1/2)

Segment	Application	Coating	Dissociation	Cell density	Culture medium	Confluence Time of treatment	Type of culture	TEER	Reference
Duodenum	Gene edited pigs	Matrigel® (1/40), 1h30 at 37 °C	TrypLE Express, 5 min at 37 °C, Single cell suspension	2 wells of 3D organoids per insert	IntestiCult™ Organoid Growth medium (Human) followed by ALI after 3 days	No indication	Culture insert, 0.33 cm^2	-	(Engevik et al., 2020)
	Infection and co-Infection with *T. gondii* and *G. duodenalis*	Inserts chilled 20 min, -20 °C Matrigel® (1:10), 16 h at 4 °C, Drying 30 min, 37 °C	Mechanical disruption, Single cell suspension	2 to 3.10^6 cells/cm^2 ↓ 6.10^5 to 1.10^6 cells/insert	DMEM/F12, 20% R-Spondin1 CM, 10% Noggin CM, 50 ng/ml EGF, 1 mM HEPES, 2 mM GlutaMax, 1× P/S, 1× N2, 1× B27, 1 mM NAC, and 10 mM nicotinamide, 50% WRN CM, 10 µM Y-27632. WRN content was reduced to 5% on day 1 and 0% on day 2. Y 27632 until day 2	Tight epithelium after 3 to 5 days. Porcine organoid derived monolayers collapsed after 6 to 9 days after establishment.	Culture insert, 0.33 cm^2	Around 250 Ω.cm^2	(Holthaus et al., 2021)
Jejunum	Characterization, amino acid transport, transcriptomics	0.5% Matrigel®, 1 h at 37 °C, 10 min air-dried	TrypLE Express, 10 min, 37 °C, single cell suspension	7.8 .10^4 cells/cm^2 ↓ 2.5.10^4 cells/insert	3D organoids growth medium (***Tableau 3***) **+ 20 % FBS**	Confluency around 3 days in 96-well plate	Culture insert, 0.33 cm^2 and 96-well plate, 0.33 cm^2	Confluent monolayer after 3 days, around 1000 Ω.cm^2. Monolayer maintained for 12–15 days when medium was replenished daily	(van der Hee et al., 2018, 2020)
	Physiological properties and *Vibrio cholerae* infection	Matrigel® (1:40)	0.05% Trypsin/EDTA, 5 min, 37 °C	2.10^5 cells/insert ↓ 1.78.10^5 cells/cm^2	Advanced DMEM/F12, 50% L-WRN CM, P/S, 50 ng/mL rmEGF, 2 mM L-glutamine, **20 % FBS,** 10 µM Y-27632	No indication	Culture insert, 1.12 cm^2	Gradually increased to reach 150 Ω.cm^2 after 18 days of culture	(Hoffmann et al., 2021)
Ileum	*Lawsonia intracellularis* infection	Matrigel® (1:100), overnight, 37 °C, dried 2 h, 37 °C	Syringe mechanical disruption	Unspecified	IntestiCult™ Organoid Growth medium (Human)	Achieved confluence ≥ 80% approximately 10 days after plating. Monolayer were infected with *L. intracellularis* at this time point.	Culture insert, 0.33 cm^2	-	(Resende et al., 2020)

TABLEAU 4 : DESCRIPTIONS DES ETUDES UTILISANT DES MONOCOUCHES DE CELLULES DERIVEES D'ORGANOÏDES INTESTINAUX DE PORC (2/2)

Segment	Application	Coating	Dissociation	Cell density	Culture medium	Confluence Time of treatment	Type of culture	TEER	Reference
Duodenum Jejunum, Ileum Colon	Porcine epidemic diarrhea virus infection	Matrigel®	0.25% trypsin-EDTA, 5 min, 37 °C, single-cell suspension	50 cells/well ↓ 150 cells/cm²	IntestiCult™ Organoid Growth medium (Human)	Used after 3 days, treatment during 3 days	96-well plate, 0.33 cm²	-	(Li et al., 2019a)
	Porcine epidemic diarrhea virus infection	Matrigel®	0.25% trypsin-EDTA, single-cell suspension	50 cells/well ↓ 150 cells/cm²	IntestiCult™ Organoid Growth medium (Human)	After differentiation for about 3–4 days, planar monolayers of 2D enteroids were ready for use in experiments	96-well plate, 0.33 cm²	-	(Li et al., 2019b)
Duodenum Jejunum Ileum	ETEC-host interaction	Collagen IV (mouse), 2.5 µg/cm² 1h, 37 °C, air-dried	0.25% trypsin, 10 min, 37 °C	0.25 to 0.40.10^5 cells/cm²	3D organoid growth medium (***Tableau 3***)	Confluence was achieved after 4–7 days depending on the growth medium	Plate	-	(Vermeire et al., 2021)
	Porcine deltacoronavirus (PDCoV) infection	Matrigel® 2.5%	Trypsin-EDTA, Single-cell suspension	4.10^4 cells/well ↓ 1.2.10^5 cells/cm²	PIPM 24h followed by Porcine Intestinal Differentiation Medium (PIDM) Refreshed every other day	Differentiation for 3 days before treatment	96-well plate, 0.33 cm²	-	(Luo et al., 2020)
	Bile acids and porcine coronavirus diarrhea	Matrigel®	0.05% Trypsin-EDTA, 5 min, 37 °C, single-cell suspension	Unspecified	IntestiCult™ Organoid Growth medium (Human)	Differentiation for 3 days before treatment	96-well plate, 0.33 cm²	-	(Yang et al., 2022)
	Porcine deltacoronavirus (PDCoV) infection	Matrigel® (1:40), 90 min, 37 °C	0.25% trypsin-EDTA, single-cell suspension	50 cells/well ↓ 150 cell/cm²	IntestiCult™ Organoid Growth medium (Human)	Differentiation for 3 days before treatment	96-well plate, 0.33 cm²	-	(Yin et al., 2020)

ALI: air liquid interface, **CM:** conditioned medium, **DMEM:** Dulbecco's modified Eagle's medium, **DTT:** dithiothreitol, **EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid, **EGF:** epidermal growth factor, **HEPES:** 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, **FBS:** fetal bovine serum, **L-WRN:** L cell line engineered to secrete Wnt3a, R-spondin 3 and Noggin, **MAPK:** p38 mitogen-activated protein kinase, **NAC:** N-acetyl cysteine, **PIPM:** Porcine Intestinal Proliferation Medium (commercial), **rm:** recombinant mouse, **rh:** recombinant human, **ROCK:** Rho-associated kinase. Antibiotics and antifungals added in the growth medium are not presented.

Objectifs

Le développement récent des organoïdes intestinaux représente une avancée majeure pour étudier l'épithélium intestinal. Chez le porc, ce nouveau modèle *in vitro* pourrait faciliter les recherches et le développement de nouvelles stratégies nutritionnelles visant à renforcer la santé digestive des porcelets. Parmi les stratégies envisagées, l'utilisation de postbiotiques composés de souches probiotiques inactivé et de leurs composants est particulièrement pertinente dans la période suivant le sevrage. Afin d'évaluer l'intérêt de ces postbiotiques, il est nécessaire de disposer de modèle mimant la dysfonction de la barrière épithéliale intestinale observée lors du sevrage des porcelets. Dans ce cadre, les organoïdes intestinaux de porcs sont des outils particulièrement prometteurs car ils permettent de contourner les principales limitations des modèles d'étude conventionnels *in vitro*.

Cependant, la caractérisation du modèle des organoïdes d'intestin de porcelet reste incomplète. En effet, peu d'études ont caractérisé le phénotype de ces organoïdes, en particulier concernant leur capacité à reproduire *in vitro* les caractéristiques du segment digestif et du stade de développement d'origine. D'autre part, les études utilisant les organoïdes de porc ont peu pris en compte la variabilité inter-individuelle en raison d'un faible nombre d'individus à l'origine des organoïdes.

Par ailleurs, dans les organoïdes cultivés en 3D, le pôle apical des cellules n'est pas accessible alors qu'il s'agit de la voie physiologique d'exposition aux composés nutritionnels tels que les postbiotiques. Pour contourner ce problème, la culture des cellules d'organoïdes d'intestin de porc en monocouche a été développée, ce qui permet d'étudier la fonction de barrière et les effets de composés luminaux (*exemple :* nutriments, bactéries). Néanmoins, cette technique manque de reproductibilité et de nombreux protocoles différents ont été décrits. D'autres part, il n'existe pas de modèle d'organoïdes d'intestin de porcelet permettant de mimer la dysfonction de la barrière épithéliale observée lors du sevrage. Enfin, les organoïdes d'intestin de porc n'ont jamais été utilisés pour tester les effets de postbiotiques.

De ces constats ont émané trois objectifs principaux :

1/ Déterminer si les organoïdes d'intestin de porcelets conservent *in vitro* les caractéristiques de leur segment digestif et de leur stade de développement d'origine

2/ Mettre au point un modèle de culture de monocouches de cellules d'organoïdes d'intestin de porcelet reproductible et permettant de mimer la dysfonction de la barrière épithéliale observée lors du sevrage

3/ Apporter la preuve de concept que le modèle de monocouches de cellules d'organoïdes d'intestin de porcelet peut être utilisé pour tester les effets de postbiotiques ciblant la fonction de barrière de l'épithélium intestinal

Afin de répondre à ces trois objectifs, nous avons utilisé différentes stratégies expérimentales dont les résultats ont été décrits dans trois études. Dans un premier temps, nous avons créé une biobanque d'organoïdes de jéjunum et de côlon de porcelets allaités ou sevrés. Nous avons comparé les profils d'expression de gènes dans ces organoïdes et dans les cryptes d'origine. Nous avons également caractérisé l'environnement luminal *in vivo* (microbiote et métabolome) pour identifier des facteurs pouvant expliquer le phénotype des organoïdes (*résultats décrits dans l'article 1*). Dans un second temps, nous avons développé et caractérisé une méthode reproductible de culture de monocouches de cellules d'organoïdes d'intestin de porcelets (*résultats décrits dans l'article 2*). Ensuite, nous avons identifié un challenge permettant d'induire une dysfonction de la barrière épithéliale dans le modèle

des monocouches de cellules d'organoïdes d'intestin de porcelets (*résultats décrits dans l'article 3*). Enfin, nous avons évalué les effets de produits dérivés de micro-organismes sur l'épithélium intestinal des porcelets en fonction des conditions de culture et en condition ou non d'une dysfonction de la barrière épithéliale (*résultats décrits dans l'article 3*).

Etudes expérimentales

Caractéristiques des organoïdes intestinaux dérivées de jéjunum et de côlon de porcelets allaités ou sevrés

Article 1

Le phénotype de la région intestinale est conservé de manière plus stable que le stade de développement dans les organoïdes intestinaux de porcelets

Eloïse Mussard, Corinne Lencina, Lise Gallo, Céline Barilly, Maryse Poli, Katia Feve, Mikael Albin, Laurent Cauquil, Christelle Knudsen, Caroline Achard, Guillaume Devailly, Laura Soler, Sylvie Combes and Martin Beaumont

Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2022

https://doi.org/10.3389/fcell.2022.983031

La caractérisation des organoïdes de porc reste incomplète, notamment concernant leur capacité à maintenir *in vitro* le phénotype de leur tissu d'origine. De plus, les données existantes ont généralement été obtenues sur des organoïdes issus de quelques individus seulement (n = 2-3). La variabilité inter-individuelle n'a donc été que peu prise en compte.

L'objectif de cette étude était de générer des organoïdes de jéjunum et de côlon à partir de porcelets allaités et sevrés (n = 12 par groupe) afin de déterminer dans quelle mesure les organoïdes conservent un phénotype spécifique de leur localisation et de leur stade de développement d'origine.

Les profils d'expression de gènes ont été comparés dans les cryptes épithéliales (*in vivo*) et dans les organoïdes (*in vitro*). De plus, le microbiote intestinal et le métabolome ont été analysés pour caractériser l'environnement luminal des cellules épithéliales à l'origine des organoïdes.

In vivo, 60 gènes étaient différentiellement exprimés entre les cryptes du jéjunum et du côlon des porcelets allaités. Ces profils d'expression spécifiques du segment digestif étaient partiellement conservés (48%) dans les organoïdes de jéjunum et de côlon. L'expression régionale de ces gènes était donc indépendante des signaux luminaux puisque les différences majeures de microbiote et de métabolome observées *in vivo* entre le jéjunum et le côlon n'ont pas été reproduites *in vitro*. En revanche, l'expression régionale d'autres gènes n'a pas été maintenue dans les organoïdes. De plus, l'expression spécifique du stade de développement de 30 gènes différentiellement exprimés entre les cryptes du jéjunum des porcelets allaités ou sevrés n'a pas été conservée de manière stable dans les organoïdes. Enfin, la différenciation des organoïdes était nécessaire pour observer l'expression régionale de certains gènes, mais elle n'était pas suffisante pour reproduire les profils d'expression spécifiques du stade de développement.

En conclusion, les organoïdes intestinaux de porcelets ont conservé un phénotype spécifique de la localisation d'origine dans l'intestin alors que les caractéristiques du stade de développement ont été effacées *in vitro*. Reproduire plus fidèlement l'environnement luminal pourrait contribuer à améliorer la pertinence physiologique des organoïdes d'intestin de porcelet.

Etude expérimentale _ Article 1
TYPE Original Research
PUBLISHED 29 August 2022
DOI 10.3389/fcell.2022.983031

frontiers | Frontiers in Cell and Developmental Biology

Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY

Misty Good,
University of North Carolina at Chapel Hill, United States

REVIEWED BY

Hala Chaaban, University of Oklahoma Health SciencesCenter, United States
Chhinder Sodhi,
SOURCE, Johns Hopkins University, United States

*CORRESPONDENCE

Martin Beaumont,
martin.beaumont@inrae.fr

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to Stem Cell Research,
a section of the journal
Frontiers in Cell and Developmental Biology
RECEIVED 30 June 2022
ACCEPTED 29 July 2022
PUBLISHED 29 August 2022

CITATION

Mussard E, Lencina C, Gallo L, Barilly C, Poli M, Feve K, Albin M, Cauquil L, Knudsen C, Achard C, Devailly G, Soler L, Combes S and Beaumont M (2022), The phenotype of the gut region is more stably retained than developmental stage in piglet intestinal organoids. *Front. Cell Dev. Biol.* 10:983031. doi: 10.3389/fcell.2022.983031

COPYRIGHT

© 2022 Mussard, Lencina, Gallo, Barilly, Poli, Feve, Albin, Cauquil, Knudsen, Achard, Devailly, Soler, Combes and Beaumont. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

The phenotype of the gut region is more stably retained than developmental stage in piglet intestinal organoids

Eloïse Mussard[1,2], Corinne Lencina[1], Lise Gallo[1], Céline Barilly[1], Maryse Poli[1], Katia Feve[1], Mikael Albin[3], Laurent Cauquil[1], Christelle Knudsen[1], Caroline Achard[2], Guillaume Devailly[1], Laura Soler[3], Sylvie Combes[1] and Martin Beaumont[1]*

[1]GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Castanet-Tolosan, France, [2]Lallemand Animal Nutrition, Blagnac Cedex, France, [3]Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

Intestinal organoids are innovative *in vitro* tools to study the digestive epithelium. The objective of this study was to generate jejunum and colon organoids from suckling and weaned piglets in order to determine the extent to which organoids retain a location-specific and a developmental stage-specific phenotype. Organoids were studied at three time points by gene expression profiling for comparison with the transcriptomic patterns observed in crypts *in vivo*. In addition, the gut microbiota and the metabolome were analyzed to characterize the luminal environment of epithelial cells at the origin of organoids. The location-specific expression of 60 genes differentially expressed between jejunum and colon crypts from suckling piglets was partially retained (48%) in the derived organoids at all time point. The regional expression of these genes was independent of luminal signals since the major differences in microbiota and metabolome observed *in vivo* between the jejunum and the colon were not reproduced *in vitro*. In contrast, the regional expression of other genes was erased in organoids. Moreover, the developmental stage-specific expression of 30 genes differentially expressed between the jejunum crypts of suckling and weaned piglets was not stably retained in the derived organoids. Differentiation of organoids was necessary to observe the regional expression of certain genes while it was not sufficient to reproduce developmental stage-specific expression patterns. In conclusion, piglet intestinal organoids retained a location-specific phenotype while the characteristics of developmental stage were erased *in vitro*. Reproducing more closely the luminal environment might help to increase the physiological relevance of intestinal organoids.

KEYWORDS

enteroids, colonoids, gut segment, age, intestinal epithelium, microbiota, metabolome, epigenetics

Abbreviations: DEG: Differentially Expressed Genes; D21: Postnatal day 21, D35: Postnatal day 35; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium; FBS: fetal bovine serum; H3K4me3: Trimethylation of lysine four of Histone three; PRR: Pattern Recognition Receptor. TSS: transcription start site.

Introduction

The mammalian intestine is covered by a single layer of epithelial cells, which constitutes a barrier between the organism and the luminal environment (Peterson and Artis, 2014). Multipotent stem cells located at the base of crypt domains continuously renew the intestinal epithelium over 4–5 day periods (Gehart and Clevers, 2019). The epithelium plays diverse roles including digestion and absorption of nutrients, detection of pathogens and protection against harmful luminal components (Peterson and Artis, 2014). The multiple functions of the gut epithelium are supported by differentiated epithelial cells specialized for absorption (absorptive cells) or secretion of mucus (goblet cells), antimicrobial peptides (Paneth cells) and hormones (enteroendocrine cells) (Barker, 2014).

Recent advances in intestinal stem cell biology have enabled the *in vitro* culture of self-organizing three-dimensional epithelial structures called organoids (Sato et al., 2009). In contrast to cell lines, intestinal organoids are composed of primary non-transformed cells that can differentiate into each type of epithelial cell. This novel model is a powerful tool to study intestinal epithelium biology in various fields, including nutrition, host-microbe interactions, disease modeling and drug screening (In et al., 2016). Importantly, several studies have shown that intestinal organoids retain some of the characteristics of their tissue of origin, independently of the presence of mesenchyme or luminal signals (e.g. nutrients, microbiota and its metabolites). For instance, the epithelial phenotype observed in patients with digestive diseases are at least in part maintained in organoid culture, probably through anepigenetic imprinting of stem cells (Dotti et al., 2017; Howellet al., 2018; Freire et al., 2019; d'Aldebert et al., 2020).

A location-specific phenotype is also retained in human and mouse organoids derived from the small or large intestine, notably through the maintenance of a location-specific DNA methylation profile (Middendorp et al., 2014; Kraiczy et al., 2019; Kayisoglu et al., 2021). For instance, regional expression patterns of digestive enzymes and innate immune signaling components observed *in vivo* are maintained in organoids (Comelli et al., 2009; Kayisoglu et al., 2021). However, the *in vitro* maintenance of gut region characteristics is only partial and important differences are still observed at the transcriptome levelbetween organoids and their tissue of origin (Middendorp et al., 2014; Kraiczy et al., 2019). It also remains unclear whether intestinal organoids retain the phenotype of their developmental stage of origin. Indeed, Senger et al. (2018)showed that the expression of developmentally regulated genes was stable in human fetal organoids. However, other studies demonstrated that fetal organoids undergo *in vitro* maturation, which was not observed in human and mouse organoids obtained after birth (Kraiczy et al., 2019; Navis et al., 2019). Interestingly, the expression of digestive enzymes in mouse fetal organoids matures over time *in vitro*, following a pattern characteristic of the changes observed *in vivo* at the suckling-to-weaning transition (Navis et al., 2019).

The methods used to culture human and mouse organoids were recently adapted to the pig intestine (Gonzalez et al., 2013; Khalil et al., 2016; Derricott et al., 2019; van der Hee et al., 2020; Beaumont et al., 2021a). The pig is an excellent model for studying the physiology of the human intestine due to greater similarities with this species compared to rodents regarding nutrition, gut structure, functionality and microbiota (Heinritz et al., 2013). Moreover, well characterized *in vitro* models of the pig intestinal epithelium are required for veterinary research (Beaumont et al., 2021a). Pig intestinal organoids retain to some extent a region-specific phenotype (van der Hee et al., 2020; Barnett et al., 2021) but these studies did not consider inter-individual variability since organoids were derived from a limited number of piglets (n = 2–3). Mohammad et al. (2020) showed that jejunum organoids derived from suckling and weaned piglets failed to retain the age-specific expression of digestive enzymes observed *in vivo*. However, it is not known whether pig organoids retain the major alterations of the epithelial barrier function observed at the suckling-to-weaning transition in piglets (Moeser et al., 2017). Moreover, a detailed characterization of the luminal environment (metabolome, microbiota) from which pig organoids originate is lacking, while it could be helpful to generate hypothesis regarding external factors required in the culture medium to maintain the original phenotype *in vitro*.

In this study, we generated jejunum and colon organoids from twelve suckling and twelve weaned piglets. Indeed, jejunum and colon have major functional and microbiota differences and the suckling-to-weaning transition is a key step of intestinal maturation. Our objective was to compare the gene expression profiles *in vivo* in epithelial crypts and *in vitro* in organoids at three time points to determine the extent to which organoids retained a regional and developmental stage-specific phenotype. We also analyzed the luminal metabolome and microbiota composition in order to characterize the environment of the intestinal stem cells at the origin of organoids.

Material and methods

Animals and sample collection

All animal experimentation procedures were approved by the local ethics committee (N°TOXCOM/0136/PP) in accordance with the European directive on the protection of animals used for scientific purposes (2010/63/EU). Piglets were obtained from a local farm (Gaec de Calvignac, Saint Vincent d'Autejac, France). From birth to day 21, piglets were exclusively suckling. Between day 21 and day 28, piglets were suckling and had access to a commercial solid starter diet for piglets (Belecla, CCPA). At day 28, piglets were weaned and moved in an experimental animal facility (Toxalim, INRAE, Toulouse, France) where they had

access to the same commercial solid feed as prior to weaning. Samples were collected at day 21 from twelve suckling piglets (n = 6 castrated males, n = 6 females, mean body weight: 7.05 kg, s. e.m: ± 0.30 kg) and at day 35 from twelve weaned piglets (n = 6 castrated males, n = 6 females, mean body weight: 9.07 kg, s. e.m: ± 0.33 kg) (Supplementary Figure S1). The experiments were divided into three batches of suckling piglets and three batches of weaned piglets. Piglets were slaughtered by electronarcosis followed by exsanguination. Jejunum (middle part of the small intestine between the stomach and the caecum) and colon (central flexure) tissues were collected and stored in ice-cold PBS (Fisher Scientific, cat#10010–056) supplemented with 1% penicillin/streptomycin (Sigma- Aldrich, cat#P4333) before processing as described below. Jejunum and colon contents adjacent to the sampling site of tissues were collected and stored at −80°C until analysis.

Isolation of intestinal crypts

Jejunum and colon tissues (~2–3 cm in length) were opened longitudinally and washed with cold PBS. Tissues were transferred to a Petri dish filled with cold PBS and gently scraped with a microscope slide to remove mucus and jejunum villi before transfer to a dissociation solution [PBS containing 9 mM EDTA (Fisher Scientific, cat# AM9260G), 3 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, cat# 10197777001), 10 µM ROCK inhibitor Y27632 (ATCC, cat#ACS-3030] and 1% penicillin/streptomycin). After 30 min of incubation at room temperature on a rotating shaker, tissues were transferred in a Petri dish filled with cold PBS. Crypts were isolated from the tissue by firm scraping with a microscope slide and filtered with a 100 µm cell strainer. After centrifugation (500 g, 5 min, 4°C) the pellet was re-suspended in cold Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Fisher Scientific, cat#31966047) supplemented with 10 µM Y27632 and crypts were counted with an hemocytometer. An aliquot was centrifuged (500 g, 5 min, 4°C) and the crypt pellet was lyzed in TRI Reagent (Zymo Research, cat# R2050) and stored at −80°C until RNA purification.

Intestinal organoid culture

Crypts were seeded at a density of 150 crypts per 25 µL of Matrigel (Corning, Cat #354234) in pre-warmed 48-well plates. After polymerization (20 min, 37°C, 5% CO_2), 250 µL of IntestiCult Organoid Growth Medium (Human) (STEMCELL Technologies, cat#06010) supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 10 µM Y27632 was added. The medium was replaced every 2–3 days, without Y27632. Jejunum organoids were obtained from all suckling and weaned piglets (n = 12 pergroup). Colon organoids were obtained from all suckling piglets(n = 12) but from only five weaned piglets, due to a high rate of contamination probably derived from the gut microbiota. Thus, we did not include colon organoids from weaned piglets in our analyses. Previous studies reported the successful growth of colon organoids from weaned pigs (Barnett et al., 2021), indicating that our protocol was suboptimal for the colon of weaned piglets (washing procedure or antibiotics used). Organoids were subcultured at day 5 (passage 1, P1) and at day 9 (passage 2, P2) after seeding. For passaging, organoids were washed with warm PBS, broken by pipetting in EDTA-trypsin 0.25% w/v (Fisher Scientifc, cat#11560626) before incubation (5 min, 37°C, 5% CO_2) and centrifugation (300 g, 5 min, room temperature). The pellet was re-seeded in Matrigel with a dilution ratio between 1:5 and 1:8 (according to the density of the organoids) and cultured as described before without Y27632. At post-seeding day 5 (P0), 9 (P1) and 13 (P2), organoids were counted according to their spherical or non-spherical morphology by bright field optical microscopy (Eclipse Ts2, Nikon Instruments) and with the ImageJ Software. At post-seeding day 5 (P0), 9 (P1) and 13(P2), organoids (pool of six wells) were washed with PBS and lyzed in TRI Reagent before storage at −80°C until RNA purification. Organoids were cryoconserved at P1 by pooling 4-6 Matrigel domes in freezing medium (80% DMEM, 10% DMSO, 10% fetal bovine serum (FBS, Fisher Scientific cat#10270106), 10 µM Y27632) before transfer in a cryotube and freezing in CoolCell LX (Corning, cat# 432138) at −80°C until transfer in liquid nitrogen for long term storage.

Differentiation of organoids

Organoids frozen at P1 were thawed and cultured for 1 week before passaging as described above. After 7 days of culture in IntestiCult Organoid Growth Medium (Human), the medium was replaced for 2 days by a differentiation medium lacking niche factors (DMEM supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin). At day 9, organoids (pool of six wells) were washed with PBS and lyzed in TRI Reagent before storage at −80°C until RNA purification.

Gene expression

Gene expression was analyzed in epithelial crypts and in organoids at P0, P1, P2 and in the differentiated organoids. Total RNA from crypts and organoids was purified with the Direct-zol RNA MiniPrep Plus kit (Zymo Research, cat#R2072) according to the manufacturers instructions. A DNAse I digestion step was included to remove genomic DNA. After elution in RNase-free water, RNA concentration was determined using a Nanodrop and cDNA were prepared from 500 ng RNA with the GoScript Reverse Transcription Mix, Random primer (Promega, cat# A2801) following the manufacturers instructions. cDNA were diluted 1:2 (v/v) in DNAse/RNAse free water and storedat −20°C. Gene expression was analyzed by real-time qPCR

using QuantStudio six Flex Real-Time PCR System (Thermofisher) and Biomark microfluidic system using 96.96 Dynamic Arrays IFC for gene expression (Fluidigm) according to the manufacturers recommendations. The sequences of the primers used are presented in Supplementary Table S1. Data were normalized to the stably expressed genes *RPL32* (crypts and organoids at P0, P1 and P2) or *GAPDH* (differentiated organoids) and analyzed with the $2^{-\Delta Ct}$ method.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)-qPCR

Jejunum and colon organoids from five suckling piglets cryopreserved at passage one were thawed and cultured for 1 week before passaging as described above. ChIP was performed 7 days post-seeding. Organoids in matrigel were washed in PBS and dissociated into single cells by pipetting after incubation in EDTA-trypsin 0.25% w/v for 15 min at 37°C.ChIP targeting H3K4me3 was performed with 500 000 cells from each organoid line with the True MicroChIP-seq Kit (Diagenode, Cat#C01010132), following the manufacturers instructions. Briefly, protein-DNA were cross-linked for 8 min with 1% paraformaldehyde before quenching with glycine, cell lysis and fragmentation of the cross-linked chromatin using a Bioruptor Pico (Diagenode) with six cycles (30 s ON/OFF).An input of each sample was saved before immunoprecipitation. H3K4me3-DNA complexes were immunoprecipitated with an antibody targeting H3K4me3 (0.5 µg per reaction, provided in the kit) and protein-A magnetic beads. Cross-links were reversed and DNA was purified using DiaPure columns and eluted in 35 µL DNA elution buffer. qPCR was performed on input (diluted 1:10) and immunoprecipitated DNA with primers targeting the transcription start site (TSS) of the housekeeping gene HPRT (F: 5′-GGCATGCGTGGACTGGTATT-3′, R: 5′-TGAGGATGC AACGAGGCAAT-3′), TLR4 (F: 5′-TGCTTTCTCCGGGTC ACTTC-3′, R: 5′-AAGGGTCCCAGCTCTCAGAT-3′) and LYZ (F: 5′-CCAGAGCTCCGAGACAACAG-3′, R: 5′-CGG CGGTTTCTTTTGTGTGT-3′) and intronic regions of TLR4 (F: 5′-CCTCTGATGGATGAGCTGCC-3′, R: 5′-AGCAAT GAAGAGGCCCACAA-3′) and LYZ (F: 5′-CCATACGGA GGCCAGAAGAC-3′, R: 5′-GGAGTTGAAGCGACACTCCT-3′), used as negative controls. qPCR was performed using a QuantStudio six real-time PCR detection system (Thermo Fisher Scientific). The results were expressed as $2^{\Delta\Delta Ct}$ with $\Delta\Delta Ct=(Ct_{Input}-Ct_{H3K4me4})_{Target\ gene}—(Ct_{Input}-Ct_{H3K4me4})_{Reference\ gene}$. The gene expression of *TLR4* and *LYZ* were analyzed in the organoids used for ChIP as described above.

Histological analysis

Transverse sections of jejunum and colon tissues with luminal content were fixed in Carnoy's solution (60% ethanol, 30% chloroform, 10% glacial acetic acid) for 3 h before transfer in 70% ethanol, embedding in paraffin and staining with Alcian blue and Periodic Acid Schiff at the histology platform Anexplo (Genotoul, Toulouse, France). Slides were digitalized and villus height and crypt depth were measured with the CaseViewer 2.3 software (3DHISTECH). The measurements were repeated twice by two independent investigators blinded to the groups.

16S rRNA gene sequencing and sequence analysis

DNA was extracted from jejunum and colon contents using the Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit (Zymo Research, cat# 6010) and the 16S rRNA gene V3−V4 region was amplified by PCR and sequenced by MiSeq Illumina Sequencing as previously described (Verschuren et al., 2018). Sequencing reads were deposited in the National Center for Biotechnology Information Sequence Read Archive (SRA accession: PRJNA800253). 16S rRNA gene ampliconsequences were analyzed using the FROGS pipeline (version 3.2) according to standard operating procedures (Escudié et al., 2018). Amplicons were filtered according to their size (350–500 nucleotides) and clustered into OTUs using Swarm (aggregation distance: step 1 with d = 1 and step 2 with d = 3). After chimera removal, OTUs were kept when representing more than 0.005% of the total number of sequences and were shared by at least four individuals (Bokulich et al., 2013). OTUs were classified using the reference database silva138.1 16S with a pintail quality of 100 (Quast et al., 2013). The mean numberof reads per sample was 33,916 (min: 23,731–max: 46,485).

Nuclear magnetic resonancemetabolomics

The metabolome was analyzed in jejunum and colon content (50 mg) by using nuclear magnetic resonance (NMR) at the MetaboHUB-MetaToul-AXIOM metabolomics platform (Toulouse, France) as described previously (Beaumont et al., 2021b). Annotated representative spectra in each group are presented in Supplementary Figure S2. For each of the34 identified metabolites, buckets non-overlapping with other metabolites were selected for quantification (Supplementary Table S2).

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using the R software (version 4.1.1). The microbiota composition analysis was performed using the Phyloseq package (version 1.36.0) (McMurdie and Holmes, 2013). For *a* and *ß* diversityanalyses, the samples were rarefied to even sequencing depth (23,731 reads per sample). Observed OTUs and Shannon *a*-diversity indices were calculated. The *ß*-diversity wasanalyzed using the Bray-Curtis distance and plotted by non- Metric Dimensional Scaling (nMDS). OTUs unrarefied counts were agglomerated at phylum or family level and relative abundances were calculated at each taxonomic level. Metabolome and gene expression data were log-10 transformed while the bacterial relative abundance data were transformed to the power of 0.25. Gene expression data were analyzed separately in crypts and in organoids at each passage (P0, P1, P2). For samples in which the expression of some geneswas undetectable, half of the lowest expression value measuredfor these genes was imputed. We focused our analyses on two comparisons: 1) jejunum versus colon in suckling piglets (gut region effect) and 2) jejunum of suckling versus weaned piglets(developmental stage effect). All statistical analyses were performed with linear mixed models (R packages lme4, car and emmeans) with the gut region (jejunum or colon) or developmental stage (suckling or weaned) as fixed effect, while piglets and sampling batch were random effects. No effect of sex was observed in our data, and was thus not considered in statistical analyses. *p*-values were adjusted for multiple-testing with the Benjamini and Hochberg method. For ChIP-qPCR experiments, paired t-tests were used to compared jejunumand colon for each genomic region. Differences were considered significant when *p*-value was ≤ 0.05. PCA were performed with the mixOmics package (version 6.16.3) (Rohart et al., 2017). The heatmaps were created using the pheatmap package (version 1.0.12) with complete method algorithm and Euclidean distances for clustering.

Results

A location-specific phenotype is retainedin jejunum and colon organoids from suckling piglets

Our first objective was to determine if jejunum and colon organoids from suckling piglets retained a location-specific phenotype (Figure 1A). *In vivo*, we observed, as expected,major differences in morphology, metabolome and microbiota between the jejunum and the colon of suckling piglets. Villi were present only in the jejunum and crypts were deeper in the colonthan in the jejunum (Figure 1B). The luminal relativeconcentration of several amino acids, choline, glycerol, creatine and lactate was higher in the jejunum while the concentration of gut microbiota-derived metabolites was higher in the colon (Figure 1C and Supplementary Table S3). The gut microbiota *a*-diversity indices were higher in the colon than in the jejunum and a distinct microbiota structure was observed in each segment (Figure 1D). Lactobacillaceae (73%) was the dominant family in the jejunum while Lachnospiraceae(15%), Lactobacillaceae (13%), Oscillospiraceae (13%) and Prevotellaceae (12%) were the dominant families in the colon (Supplementary Table S4).

Jejunum and colon organoids were obtained from all suckling piglets (n = 12) (Figure 2A). The density of organoids derived from the jejunum and the colon was similar in the primary culture (P0) (Figures 2A,B). At passage1 (P1), the density of organoids increased and was higher in organoids derived from the colon than from the jejunum while no difference was observed between segments at passage 2 (P2). Spherical and non-spherical organoids were obtained from the jejunum and colon at each passage. At P0, organoids were more spherical in the jejunum than in the colon, while at P1 and P2 organoids were more spherical in the colon (Figure 2C).

We analyzed the gene expression of 89 genes in jejunum and colon epithelial crypts from suckling piglets and in the derived organoids at P0, P1 and P2. PCA revealed a distinct gene expression profile between the jejunum and the colon and between crypts and organoids (Figure 2D). Interestingly, the gene expression profile observed in crypts appeared more similar to the expression patterns observed in organoids at P0 than at later passages.

In crypts, 60 out of the 89 genes analyzed (67%) were differentially expressed between the jejunum and the colon of suckling piglets (Figure 3A and Supplementary Table S5). Genes more expressed in the jejunum crypts (30 differentially expressed genes, DEG) coded for markers of differentiated enterocytes (*ALPI*, *VIL1*, *KRT20*), digestive enzymes (*SI*, *LCT*), enterohomones (*CCK*, *GCG*, *CHGA*, *NEUROG3*), transporters and sensors of nutrients (*FABP1*, *FABP2*, *PEPT1*, *NR1H4*, *GLUT2*), antimicrobial peptides (*LYZ*, *REG3G*, *RETNLB*), proteins involved in innate immunity (*TLR5*, *LBP*, *IL8*, *CCL5*, *NLRP6*), proteins involved in immunoglobulin secretion (*PIGR*, *TNSF13B*), proteins involved in proteolytic activity (*F10*, *MEP1B*), a tight junction protein (*CLDN2*) and stem cell and proliferation markers (*SMOC2*, *MKI67*, *OLFM4*). Genes more expressed in the colon crypts (30 DEG) coded for markers of colonocytes (*CA1*, *CA2*, *AQP8*), an antimicrobial peptide (*DEFB1*), proteins involved in innate immunity (*TLR2*, *TLR4*, *NFKB2*, *CCL20*), proteins involved in mucus production (*MUC1*, *MUC2*, *SPDEF*, *KLF4*, *ATOH1*), redox enzymes (*PTGS2*, *NOX1*, *GPX1*, *GPX2*, *DUOX2*, *DUOXA2*), proteins involved in proteolytic activity (*PI3*, *SLPI*, *F2R*, *ST14*), cell junction proteins (*TJP3*, *CDH1*), a cytokine involved in immunoglobulin secretion (*TNFS13*), nutrient transporters(*GLUT1*, *FABP6*) and stem cell markers (*SOX9*, *LGR5*).

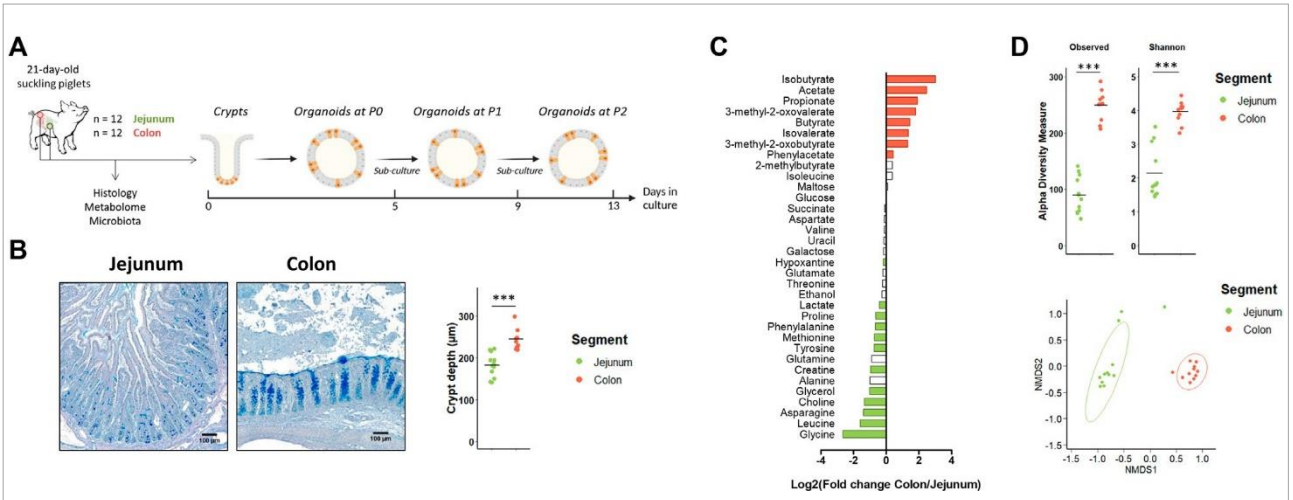


FIGURE 1
In vivo characteristics of jejunum and colon in 21-day-old suckling piglets. (A). Experimental design for the culture of jejunum and colon organoids from 21-day-old suckling piglets (n = 12 per group). (B). Histological observations and crypt depth of jejunum and colon sections stainedwith Alcian blue and Periodic Acid Schiff. Scale bars represent 100 µm. (C). Mean Log2 fold change of the relative abundance of metabolites in colon(n = 11) versus jejunum (n = 12). Significant differences ($p < 0.05$) are indicated in red (metabolites more abundant in colon than in jejunum) or in green (metabolites more abundant in jejunum than in colon). (D). Observed OTUs and Shannon *a*-diversity index and Non-Metric Dimensional Scaling (nMDS) two-dimensional representation of the microbiota *ß*-diversity using Bray-Curtis distance calculation (stress = 0.06) in the jejunum(n = 12) and colon (n = 11) contents. ***: $p < 0.001$.

In organoids, 48% of the DEG identified *in vivo* were also differentially expressed at each time point (P0, P1 and P2) between jejunum and colon organoids from suckling piglets (Figures 3B–D and Supplementary Table S5). All of theseDEG showed the same direction *in vivo* and *in vitro*, when comparing the jejunum and colon. DEG identified both in crypts and in organoids covered a broad range of epithelial functions: markers of enterocytes/colonocytes (*CA1*, *ALPI*), digestive enzymes and transporters of nutrients (*SI*, *FABP2*, *PEPT1*), enterohormones (*CCK*, *GCG*, *CHGA*), antimicrobial peptides (*LYZ*, *REG3G*, *DEFB1*, *RETNLB*), a mucin (*MUC1*), proteins involved in innate immunity (*TLR2*, *TLR4*, *LBP*, *IL8*, *NLRP6*), redox enzymes (*NOX1*, *PTGS2*, *GPX1*), proteins involved in proteolytic activity (*PI3*, *SLPI*, *F10*, *MEP1B*), an immunoglobulin transporter (*PIGR*), a cell junction protein (*CLDN2*) and stem cell markers (*SMOC2*, *OLMF4*).

In contrast, 52% of the DEG identified *in vivo* when comparing jejunum and colon epithelial crypts from suckling piglets were either 1) maintained between jejunum and colon organoids at some but not all passages (27% of DEG), 2) maintained between jejunum and colon organoids at all passages but with an opposite direction when compared to crypts (3% of DEG), 3) not maintained between jejunum and colon organoids (22% of DEG). Genes whose location-specific expression profile was partially or totally erased *in vitro* were involved in several epithelial functions including digestion, nutrient transport and sensing (*LCT*, *GLUT1*, *GLUT2*, *FABP1*, *FABP6*, *NR1H4*), enterohormone secretion (*NEUROG3*), innate immunity (*NFKB2*, *TLR5*, *CCL5*, *CCL20*), immunoglobulin secretion (*TNFSF13*, *TNFSF13B*), mucus secretion (*MUC2*, *SPDEF*, *KLF4*, *ATOH1*), redox homeostasis (*DUOX2*, *DUOXA2*, *GPX2*), proteolytic activity (*F2R*, *ST14*), cell junctions (*TJP3*, *CDH1*), epithelium renewal (*MKI67*, *SOX9*, *LGR5*) and markers of enterocytes/colonocytes (*VIL1*, *AQP8*, *CA2*) or differentiation (*KRT20*).

We hypothesized that the loss of some location-specific gene expression patterns might be due to a low differentiation level in organoids when cultured in IntestiCult medium which is known to promote proliferation (Zietek et al., 2020). Thus, we thawed a subset of jejunum and colon organoids from suckling piglets (n = 4/group) and cultured them for 2 days in a differentiation medium lacking niche factors. We focused our analysis ongenes which *in vivo* regional expression was not retained in organoids cultured in IntestiCult at P2 (Figure 3D). The expression of *LCT*, *GLUT2*, *VIL1* and *CCL5* was higher in differentiated organoids derived from jejunum than from colon, which corresponds to the regional expression pattern observed *in vivo* (Supplementary Figure 3A–B and Figure 3A).In contrast, the location-specific expression of *NEUROG3*, *DUOX2*, *MUC2* and *KLF4* was not observed in differentiated organoids. These results indicate that promoting differentiation in organoids might help to reproduce the location-specific gene expression pattern of some but not all genes.

As a next step, we explored the epigenetic regulations underlying the regional expression of *TLR4* and *LYZ* in a

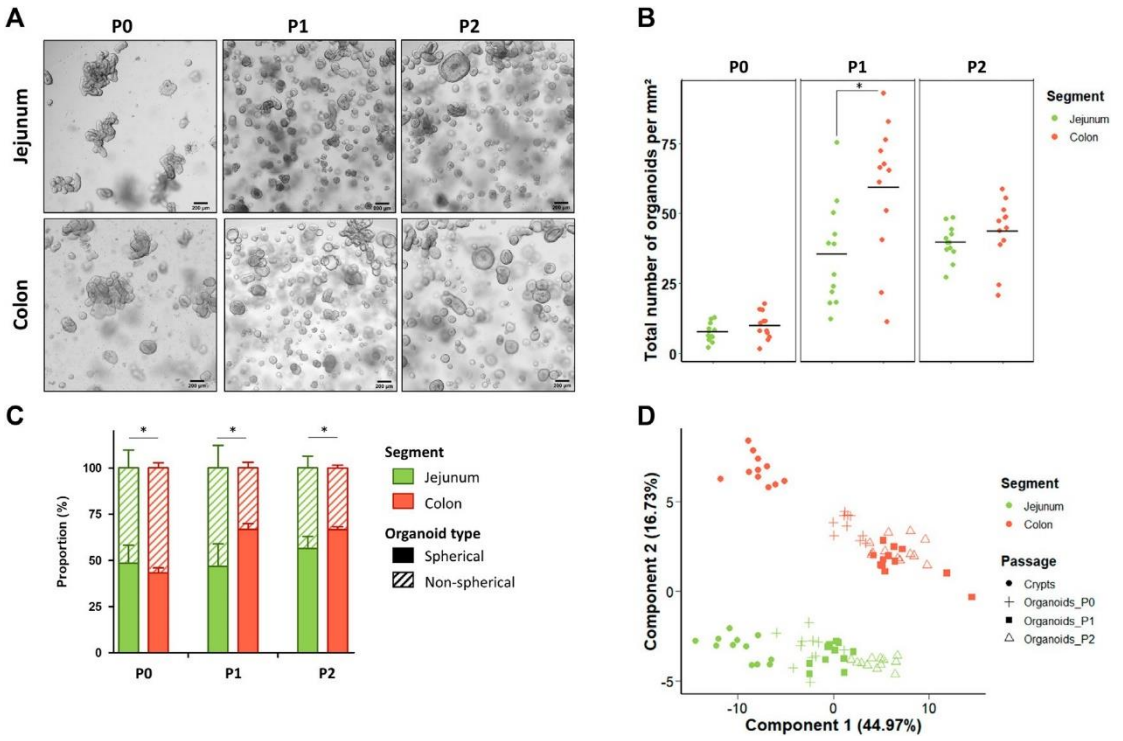


FIGURE 2
Characteristics of jejunum and colon organoids derived from 21-day-old suckling piglets. (A). Representative images showing jejunum and colon organoids from 21-day-old suckling piglets at each passage. The scale bar represents 200 µm. (B). Total number of jejunum and colon organoids per mm^2 at each passage (n = 12 per group). (C). Proportion of jejunum and colon organoids according to their spherical or non-sphericalmorphology at each passage (n = 12 per group). (D). Principal component analysis (PCA) plot of the expression of 89 genes in crypts (n = 12 jejunum, n = 11 colon) and organoids at primary culture (n = 11 jejunum, n = 10 colon), passage 1 (n = 11 jejunum, n = 12 colon) and passage 2 (n = 12 jejunum, n = 12 colon). *: $p < 0.05$.

subset of jejunum and colon organoids of suckling piglets (n = 5 per group). We performed ChIP-qPCR to quantify the trimethylation of histone H3 lysine 4 (H3K4me3), a mark associated with gene activation (Supplementary Figure 4). As expected, H3K4me3 was higher in the promoter (TSS) of *TLR4* and *LYZ* when compared to intronic regions. The higher mRNA level of *TLR4* in colon organoids when compared to jejunum organoids was associated with higher H3K4me3 in *TLR4* TSS in four out of five piglets, but this result was not statistically significant. The higher mRNA level of *LYZ* in jejunum organoids when compared to colon organoids was not correlated with H3K4me3 in *LYZ* TSS. Thus, our result suggest that H3K4me3 is not the main driver of the regional expression of *TLR4* and *LYZ* in organoids.

Altogether, our results show that jejunum and colon organoids from suckling piglets retained a partial location-specific gene expression signature. The maintenance of thegene expression pattern of the gut region in organoids appeared to be gene-specific rather than epithelial function- specific and is influenced by the culture conditions.

Developmental stage-specific phenotype is not stably maintained in jejunum organoids derived from suckling and weaned piglets

Our second objective was to determine if jejunum organoids from suckling and weaned piglets retained a developmental stage-specific phenotype (Figure 4A). *In vivo*, we observed, as expected, differences in the jejunum morphology, luminal metabolome and microbiota between suckling and weaned piglets. Villus height decreased after weaning while crypt depth increased after weaning (Figure 4B). The luminal relative concentration of 7 amino acids and succinate was higher in the jejunum of suckling piglets while the relative concentration of glucose, maltose, three amino acids and choline was higher in weaned piglets (Figure 4C and Supplementary Table S6). The Shannon index of *a*-diversity was higher in the jejunum of suckling piglets while the richness was not different (Figure 4D). A distinct microbiota structure was observed between suckling and weaned piglets but

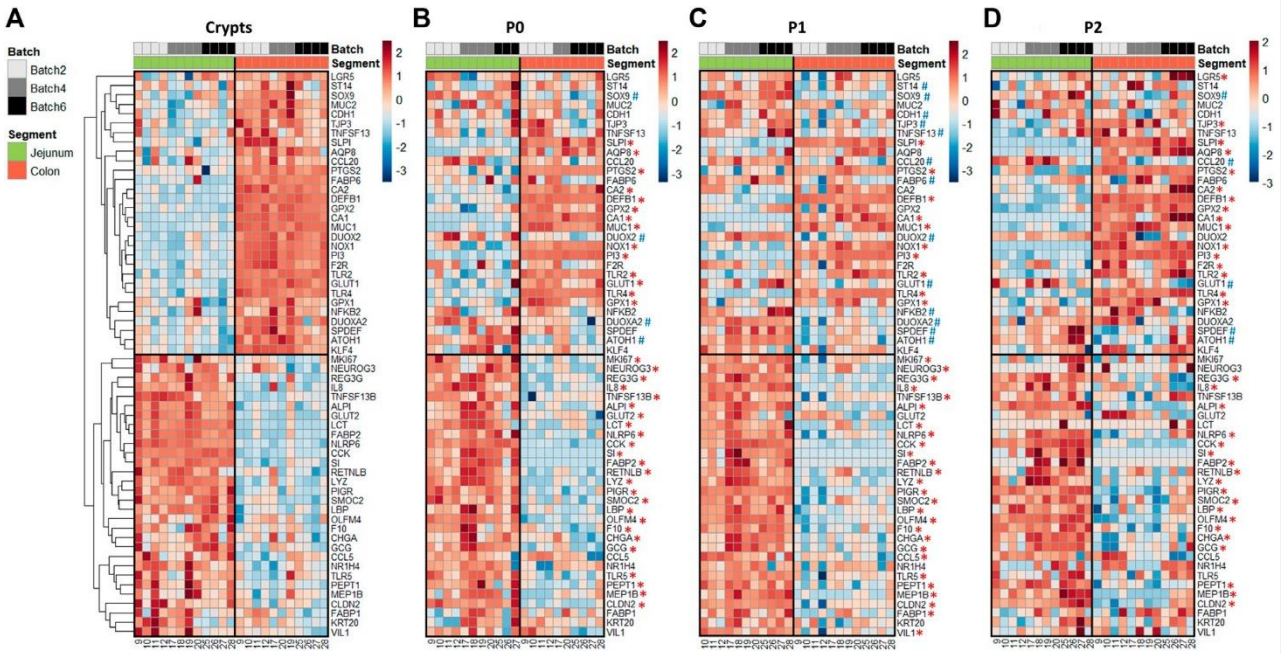


FIGURE 3
Gene expression profiles in jejunum and colon crypts and organoids from 21-day-old suckling piglets. Heatmap representing the relative expression of genes (rows) in each 21-day-old suckling piglet (columns) in jejunum and colon crypts (*n* = 12 jejunum, *n* = 11 colon) (A), organoids atprimary culture (n = 11 jejunum, *n* = 10 colon) (B), passage 1 (*n* = 11 jejunum, *n* = 12 colon) (C) and passage 2 (*n* = 12 jejunum, *n* = 12 colon) (D). Thenumbers at the bottom are piglet identifiers. The colors represent the Z-scores (row-scaled relative expression) from low (blue) to high values (red). Genes (rows) were clustered in crypts and presented in the same order in organoids. *: significant difference in organoids with the samedirection as observed in crypts. #: significant difference in organoids in the opposite direction of the observed in crypts.

these differences were mainly related to the higher abundance of a single family (Peptostreptococcaceae) in the jejunum of suckling piglets (7.0%) when compared to weaned piglets (2.2%) (Figure 4D and Supplementary Table S7).

Jejunum organoids were obtained from all suckling and weaned piglets (n = 12 per group) (Figure 5A). The density of organoids derived from the jejunum of suckling and weaned piglets was similar at P0 (Figures 5A,B). At P1, the density of organoids increased and was higher in organoids derived from suckling piglets while no difference was observed at P2. Spherical and non-spherical organoids were obtained from jejunum of suckling and weaned piglets at each passage. At primary culture P0 and passage P1, jejunum organoids were more spherical when derived from weaned piglets than from suckling piglets, while no difference was observed at P2 (Figure 5C).

We analyzed the expression of 89 genes in jejunum crypts from suckling and weaned piglets and in the derived organoids at P0, P1 and P2. PCA revealed a distinct gene expression profile between crypts and organoids (axis 1, 46% of explained variance) and between suckling and weaned piglets but to a much lesser extent (axis 4, 6% of explained variance) (Figure 5D and Supplementary Figure S5). In jejunum crypts, 30 out of the 89 genes analyzed (34%) were differentially expressed between suckling and weaned piglets (Figure 6A and Supplementary Table S8). Genes more expressed in the jejunum crypts of suckling piglets (15 DEG) coded for markers of enteroendocrine cells (*NEUROG3*, *CHGA*, *CCK*, *PYY*, *GCG*), markers of stem cells and proliferation (*SMOC2*, *LGR5*, *SOX9*, *REG4*), a tight junction protein (*CLDN*3), a transporter of electrolytes (*CFTR*), proteins involved in innate immunity (*LBP*, *RETNLB*) and proteins involved in proteolytic activity (*F5*, *F10*). Genes more expressed in the jejunum crypts of weaned piglets (15 DEG) coded for digestive enzymes (*ARG2*, *SI*), an antimicrobial peptide (*REG3G*), an immunoglobulin transporter (*PIGR*), redox enzymes (*GPX2*, *DUOX2*, *DUOXA2*, *NOX1*), proteins involved in proteolytic activity (*PI3*, *F2R*, *ST14*, *SLPI*), a cell junction protein (*CGN*), a chemokine (*CCL5*)and an apoptosis marker (*BAX*).

Only one of the DEG identified *in vivo* (*SLPI*, coding for a protease inhibitor regulating the epithelial barrier) (Ozaka et al., 2021) was also differentially expressed at each passage between jejunum organoids from suckling and weaned piglets and in the same direction as observed *in vivo* (Figures 6B–D and Supplementary Table S8). Some DEG identified between jejunum crypts of suckling and weaned piglets (*PI3*, *ST14*,*PIGR*, *GPX2*, *CGN*, *BAX*, *LBP*, *CLDN3*, *SMOC2*, *REG4*, *CFTR*) were differentially expressed between jejunumorganoids from suckling and weaned piglets at one (P0 or P2)

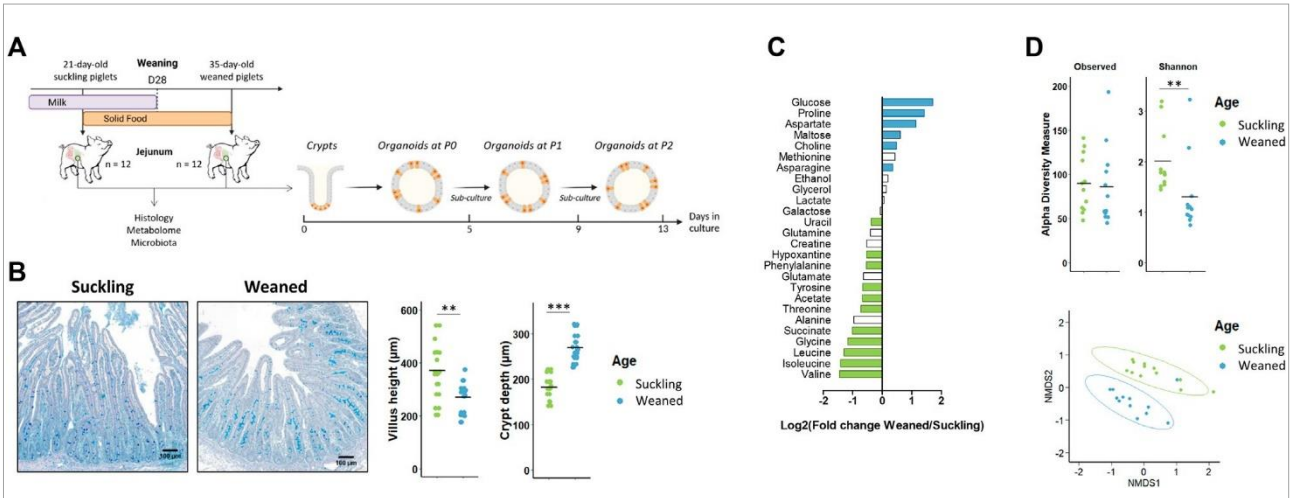


FIGURE 4

In vivo characteristics of jejunum from 21-day-old suckling and 35-day-old weaned piglets. (A). Experimental design and method used for the culture of jejunum organoids from 21-day-old suckling and 35-day-old weaned piglets (n = 12 per group). (B). Histological observations, villus heightand crypt depth of jejunum sections (stained with Alcian blue and Periodic Acid Schiff) from suckling and weaned piglets (n = 12 per group). Scale barsrepresent 100 µm. (C). Mean Log2 fold change of the relative abundance of metabolites in jejunum contents of weaned versus suckling piglets (n = 12 per group). Significant differences ($p < 0.05$) are indicated in blue (metabolites more abundant in weaned piglets) or in green (metabolites more abundant in suckling piglets). (D). Observed OTUs and Shannon *a*-diversity index and Non-Metric Dimensional Scaling (nMDS) two-dimensional representation of the microbiota *ß*-diversity using Bray-Curtis distance calculation (stress = 0.11) in the jejunum contents from suckling and weaned piglets (n = 12 per group). **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

but not at all passages and not always in the same direction. We also observed that promoting organoid differentiation did not induce the developmental stage-specific gene expression patterns observed *in vivo* in the jejunum of suckling and weaned piglets (Supplementary figure 3A, C and Figure 6A). Overall, our results obtained in the jejunum from suckling and weaned piglets indicated that the developmental stage-specific phenotype did not persist stably *in vitro* in organoids.

Discussion

Gene expression in intestinal epithelial cells vary across spatial and temporal scales under the influence of signals derived from the host and from the luminal environment (Gehart and Clevers, 2019; Heppert et al., 2021). In organoids, host-derived factors are, at least in part, replicated by the extracellular matrix scaffold and by the culture medium that includes regulators of key pathways such as WNT and BMP (Sato et al., 2011). In contrast, luminal signals such as nutrients, the gut microbiota and its metabolites are lacking in standard conditions of organoid culture. In our study, we observed major differences in gut microbiota and metabolome both between the jejunum and the colon and to a lesser extent between suckling and weaned piglets, in line with previous studies (Frese et al., 2015; Holmanet al., 2017; De Rodas et al., 2018; Beaumont et al., 2021a). These differences between the *in vivo* and the *in vitro* microenvironment of epithelial cells are probably the main drivers of the distinct gene expression in pig intestinal organoids when compared to the epithelial crypts, as described in previous reports in pig, mouse and human organoids (Kraiczy et al., 2019; Navis et al., 2019; van der Hee et al., 2020; Mohammadi et al., 2021).

We observed that, despite being cultured in the same conditions, pig organoids derived from the jejunum or from the colon retained a significant fraction (~50%) of the location-specific expression patterns observed *in vivo*, which is in agreement with previous studies in human and mouse organoids (Middendorp et al., 2014; Kraiczy et al., 2019). In contrast, the developmental stage-specific gene expression profile observed in the crypts of the jejunum from suckling and weanedpiglets was not retained in organoids. Differences in the mechanisms driving epithelial transcription according to location or developmental stage might explain why piglet organoids retained characteristics of the gut region but not of age. Indeed, the regional patterning of the intestinal epithelium begins *in utero*, independently of environmental cues (Middendorp et al., 2014; Thompson et al., 2018; Heppert et al., 2021). After birth, environmental plasticity of epithelial cells is mediated by epigenetic modifications induced notably bynutrients, the gut microbiota and its metabolites (Yu et al., 2015;Krautkramer et al., 2016, 2017; Pan et al., 2018; Heppert et al., 2021). Thus, environmental signals derived from the diet or from

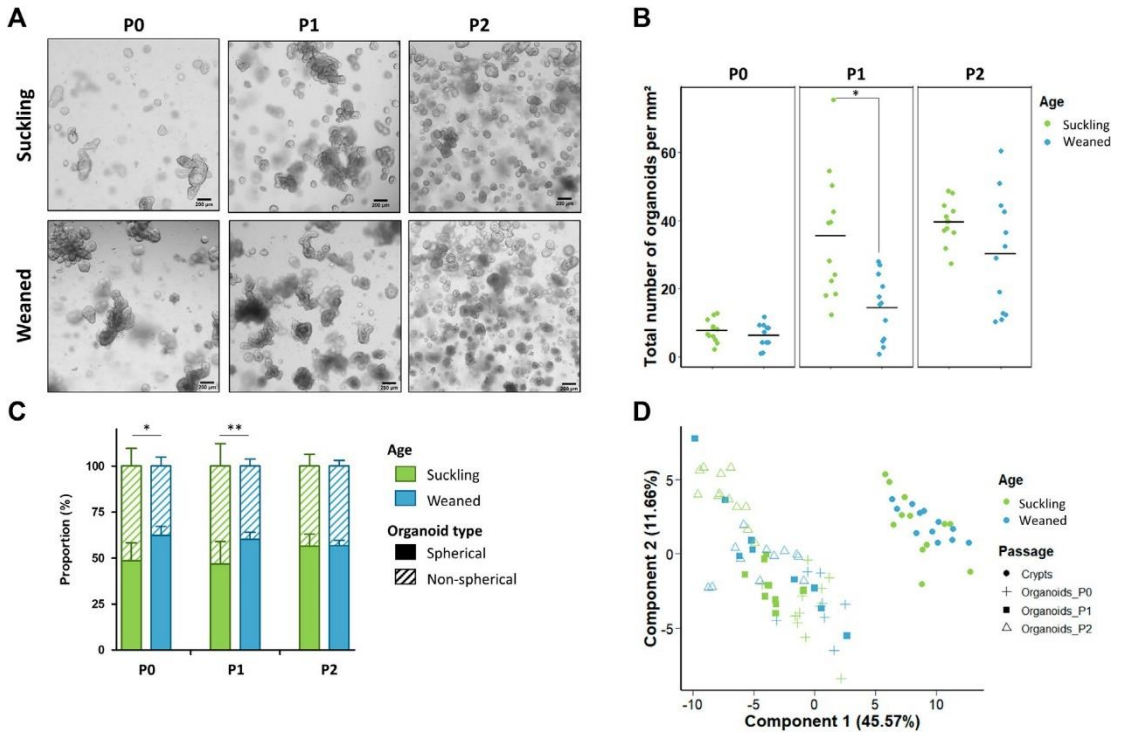


FIGURE 5
Characteristics of jejunum organoids from 21-day-old suckling and 35-day-old weaned piglets. (A). Representative images showing jejunum organoids from 21-day-old suckling and 35-day-old weaned piglets at each passage. The scale bar represents 200 µm. (B). Total number of jejunum organoids per mm^2 at primary culture (n = 12 suckling, n = 11 weaned), passage 1 (n = 12 suckling, n = 12 weaned) and passage 2 (n = 12 suckling, n = 12 weaned). (C). Proportion of organoids according to their spherical or non-spherical morphology at each passage. (D). Principal component analysis (PCA) plot of the expression of 89 genes in jejunum crypts (n = 12 suckling, n = 11 weaned) and organoids at primary culture (n = 11 suckling, n = 7 weaned), passage 1 (n = 11 suckling, n = 9 weaned) and passage2 (n = 12 suckling, n = 12 weaned). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

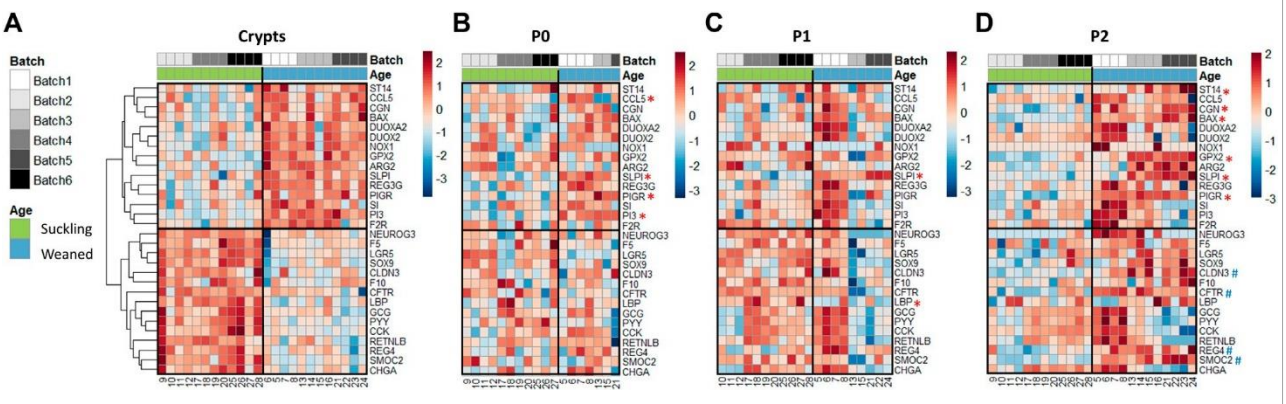


FIGURE 6
Gene expression profiles in jejunum crypts and organoids from 21-day-old suckling and 35-day-old weaned piglets. Heatmap representing the relative expression of genes (rows) in 21-day-old suckling and 35-day-old weaned piglet (columns) in jejunum crypts (n = 12 per group) (A), organoids at primary culture (n = 11 suckling, n = 7 weaned) (B), passage 1 (n = 11 suckling, n = 9 weaned) (C) and passage 2 (n = 12 suckling,n = 12 weaned) (D). The numbers at the bottom are piglet identifiers. The colors represent the Z-scores (row-scaled relative expression) from low (blue) to high values (red). Genes (rows) were clustered in crypts and presented in the same order in organoids. *: significant difference inorganoids in the same direction as observed in crypts. #: significant difference in organoids in the opposite direction of the observed in crypts.

the gut microbiota might be required for the replication in pig intestinal organoids of a postnatal age-specific phenotype. The lower amplitude of the transcriptional differences observed during the suckling-to-weaning transition over 2 weeks when compared to gut regions might also explain why we did not observe the maintenance of a developmental-stage specific phenotype in piglet organoids.

Pattern recognition receptors (PRR) are key sensors of microbial ligands and their expression follows a specific pattern along the longitudinal axis of the intestine (Price et al., 2018; Arnaud et al., 2020; Kayisoglu et al., 2021). We observed that the location-specific expression profile of PRR (*TLR2, TLR4, NLRP6*) in piglet epithelial crypts was maintained in organoids, suggesting that their regional expression do not depend on microbial signals. Experiments in germ free mice and in embryo-derived organoids also indicated that the regional expression of most PRR do not depend on the gut microbiota (Price et al., 2018; Kayisoglu et al., 2021). Interestingly, the higher expression of *TLR5* in piglet crypts from jejunum than from colon was not stably maintained in piglet organoids, which is consistent with a previous study showing that epithelial expression of *TLR5* might be responsive to environmental cues (Price et al., 2018). PRR signaling in epithelial cells promotes the barrier function through the production of antimicrobial peptides and mucins, immunoregulatory responses, induction of enzymes producing reactive oxygen species and regulation of proteolytic activities (Peterson and Artis, 2014; Vergnolle, 2016; Campbell and Colgan, 2019). Although all of these components of epithelial innate immunity were previously shown to be highly responsive to the gut microbiota or their metabolic products (El Aidy et al., 2012; Larsson et al., 2012; Sommer and Bäckhed, 2015; Pan et al.,2018; Hansson, 2020), we observed that piglet organoids retained a regional patterning for antimicrobial peptides (*LYZ, REG3G, DEFB1, RETNLB*), a transmembrane mucin (*MUC1*), immunoregulatory proteins (*LBP, IL8, PIGR*), redox enzymes (*PTGS2, NOX1, GPX1*) and proteins involved in the regulation of proteolytic activity (*F10, MEP1B, PI3, SLPI*). This microbiota-independent regional patterns are consistent with the minimal differences in gene expression observed between organoids derived from conventional and germ-free mice (Janeckova et al., 2019; Hausmann et al., 2020). Additional studies would be required to test whether the transcriptional differences between jejunum and colon organoids translate into functional differences. For instance, it would be interestingto test whether the higher expression of *TLR4* in pig colon organoids is associated with a higher responsiveness to lipopolysaccharides when compared to jejunum organoids, as described previously in human organoids (Kayisoglu et al., 2021).

Post-translational modification of histones is an important epigenetic mechanism driving regional gene expression in intestinal epithelial cells (Heppert et al., 2021). However, we observed that the segment-specific expression of *TLR4* and *LYZ* in the jejunum and colon organoids from suckling piglets was not associated with changes in promoter H3K4me3, which marks regions associated with higher transcriptional activation. The location-specific phenotype of pig intestinal organoids probably involves other epigenetic mechanisms, such as activity and/or level of segment-specific transcription factors or DNA-methylation, as demonstrated recently in human intestinal organoids (Kraiczy et al., 2019).

Regional patterning in the gut also supports the functional specialization of each segment for digestion, chemosensing and absorption of nutrients, water or electrolytes (Anderle et al., 2005; Gribble and Reimann, 2016; Lema et al., 2020). Piglet organoids retained the regional gene expression of some digestive enzymes (*SI*), nutrient transporters (*FAPB2, PEPT1*) and enterohormones (*CCK, GCG, CHGA*) which is consistent with previous studies in pig, human and mouse organoids (Middendorp et al., 2014; Zietek et al., 2015, 2020; Kozuka et al., 2017; Kraiczy et al., 2019; Barnett et al., 2021; Kayisoglu et al., 2021). Interestingly, some location-specific expression patterns (e.g. *LCT, GLUT2*) were observed only when piglet organoids were cultured in a medium lacking niche factors. This result is consistent with previous studies showing that differentiation of mouse or human organoids is required to reproduce the location- specific expression patterns of certain genes (Middendorpet al., 2014; Kraiczy et al., 2019; Zietek et al., 2020).

In mammals, the suckling-to-weaning transition is associated with a remodeling of the intestinal epithelial barrier function (Hooper, 2004; Pié et al., 2004; Ménard et al., 2008; Pan et al., 2018; Beaumont et al., 2020, 2022). In our study, jejunum organoids did not retain the weaning-induced upregulation of genes involved in epithelial barrier function (e.g. *DUOX2, NOX1, PIGR, REG3G, CCL5, SLPI*). Major nutritional adaptations also occur in the small intestine epithelium at the suckling-to-weaning transition, as exemplified by the induction of sucrase-isomaltase (*SI*) and arginase-2 (*ARG2*) (Henning, 1985; Navis et al., 2019; Mohammad et al., 2020). We observed that jejunum organoids derived from suckling and weaned piglets did not retain the developmental stage-specific expression patterns of digestive enzymes (*SI, ARG2*), enteroendocrine cell markers (*CCK, PYY, GCG, CHGA, NEUROG3*) and an electrolyte transporter (*CFTR*), even when cultured in a medium promoting differentiation. These results are consistent with a previous study in piglets showing that organoids do not retain the enzymatic switch observed at weaning in the jejunum (Mohammad et al., 2020). Further studies will be needed to determine if pig organoids can retain developmental stage- specific characteristics in other digestive segments (e.g. ileum or colon) or with more contrasted age differences (e.g. earlier weaning).

In our study, we observed a large proportion of spherical organoids, which is consistent with a proliferative phenotype (Merker et al., 2016) also revealed by the high density of

organoids after the first passage. Interestingly, we observed some region and age-related differences in organoid morphology and density, which could be linked to the differential expression observed *in vivo* of stem cell markers (*LGR5, SOX9, SMOC2, OLFM4*) between the jejunum and the colon and between suckling and weaned piglets. As discussed above, promoting differentiation might help to better reproduce the regional patterns of the gut in pig organoids but further optimization of the culture conditions might also help to improve the physiological relevance of the model. For instance, based on our metabolomics data, we propose that adding gut microbiota-derived metabolites such as short chain fatty acids to the culture medium of colon organoids could help to recreate *in vitro* the luminal environment of the pig large intestine, as performed before in human organoids (Freire et al., 2019; Pearce et al., 2020). Co-culture with region or developmental stage-specific bacteria, addition of nutrients derived from milk (e.g. lactose) or solid food might also help to reproduce more closely in organoids the phenotype observed *in vivo*.

In conclusion, we showed that organoids derived from the jejunum and colon of suckling and weaned piglets retained a location-specific phenotype but failed to reproduce the modifications of epithelial gene expression induced by the suckling-to-weaning transition over 2 weeks. Thus, piglet intestinal organoids represent a powerful model to study intestinal epithelium physiology in a gut region-specificmanner. Our work also identified a set of genes which regional expression is maintained *in vitro* and that could bethe focus of future studies with pig organoids. Further improvement of the culture conditions, notably by replicating more closely the luminal environment, might help to improve the physiological relevance of the intestinal organoid model.

Data Availability Statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/, PRJNA800253.

Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by All animal experimentation procedures were approved by the local ethics committee (N°TOXCOM/0136/PP) in accordance with the European directive on the protection of animals used for scientific purposes (2010/63/EU).

Author contributions

MB, SC, LS, CA and GD designed research; EM, CL, LG, CB, MP, MA, CK, KF, GD, LS and MB conducted research; EM, MB, LC, GD and SC analyzed data; and EM and MB wrote the initial draft. MB had primary responsibility for final content. All authors have read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by Institut Carnot France Futur Elevage (“OrganoPig” project). The supporting source had no involvement or restrictions regarding publication.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Genotoul core facilities (Get-PlaGE, MetaToul-Axiom, Bioinfo Genotoul, doi: 10.15454/1.5572369328961167E12) and the Sigenae group for providing computing and storage resources to Galaxy instance (http://sigenae-workbench.toulouse.inra.fr). The authors thank Philippe Pinton (INRAE Toxalim, Toulouse, France) and Tanguy Bourrec (INRAE GenPhySE, Toulouse, France) fortheir contribution to the experiments.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher’s note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.983031/full#supplementary-material

References

Anderle, P., Sengstag, T., Mutch, D. M., Rumbo, M., Praz, V., Mansourian, R., et al. (2005). Changes in the transcriptional profile of transporters in the intestine along the anterior-posterior and crypt-villus axes. *BMC Genomics* 6, 69. doi:10.1186/1471-2164-6-69

Arnaud, A. P., Rome, V., Richard, M., Formal, M., David-Le Gall, S., and Boudry, G. (2020). Post-natal co-development of the microbiota and gut barrier function follows different paths in the small and large intestine in piglets. *FASEB J.* 34, 1430–1446. doi:10.1096/fj.201902514R

Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: Critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 19–33. doi:10.1038/nrm3721

Barnett, A. M., Mullaney, J. A., Hendriks, C., Le Borgne, L., McNabb, W. C., and Roy, N. C. (2021). Porcine colonoids and enteroids keep the memory of their origin during regeneration. *Am. J. Physiology-Cell Physiology* 320, C794–C805. doi:10.1152/ajpcell.00420.2020

Beaumont, M., Blanc, F., Cherbuy, C., Egidy, G., Giuffra, E., Lacroix-Lamandé, S., et al. (2021a). Intestinal organoids in farm animals. *Vet. Res.* 52, 33. doi:10.1186/s13567-021-00909-x

Beaumont, M., Cauquil, L., Bertide, A., Ahn, I., Barilly, C., Gil, L., et al. (2021b). Gut microbiota-derived metabolite signature in suckling and weaned piglets. *J. Proteome Res.* 20, 982–994. doi:10.1021/acs.jproteome.0c00745

Beaumont, M., Mussard, E., Barilly, C., Lencina, C., Gress, L., Painteaux, L., 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. doi:10.1093/jn/nxab411

Beaumont, M., Paës, C., Mussard, E., Knudsen, C., Cauquil, L., Aymard, P., et al. (2020). Gut microbiota derived metabolites contribute to intestinal barrier maturation at the suckling-to-weaning transition. *Gut Microbes* 11, 1268–1286. doi:10.1080/19490976.2020.1747335

Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight, R., et al. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods* 10, 57–59. doi:10.1038/nmeth.2276

Campbell, E. L., and Colgan, S. P. (2019). Control and dysregulation of redox signalling in the gastrointestinal tract. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16,106–120. doi:10.1038/s41575-018-0079-5

Comelli, E. M., Lariani, S., Zwahlen, M.-C., Fotopoulos, G., Holzwarth, J. A., Cherbut, C., et al. (2009). Biomarkers of human gastrointestinal tract regions. *Mamm. Genome* 20, 516–527. doi:10.1007/s00335-009-9212-7

d'Aldebert, E., Quaranta, M., Sébert, M., Bonnet, D., Kirzin, S., Portier, G., et al. (2020). Characterization of human colon organoids from inflammatory bowel disease patients. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 363. doi:10.3389/fcell.2020.00363

De Rodas, B., Youmans, B. P., Danzeisen, J. L., Tran, H., and Johnson, T. J. (2018). Microbiome profiling of commercial pigs from farrow to finish. *J. Anim. Sci.* 96, 1778–1794. doi:10.1093/jas/sky109

Derricott, H., Luu, L., Fong, W. Y., Hartley, C. S., Johnston, L. J., Armstrong, S. D., et al. (2019). Developing a 3D intestinal epithelium model for livestock species. *Cell Tissue Res.* 375, 409–424. doi:10.1007/s00441-018-2924-9

Dotti, I., Mora-Buch, R., Ferrer-Picón, E., Planell, N., Jung, P., Masamunt, M. C., et al. (2017). Alterations in the epithelial stem cell compartment could contribute to permanent changes in the mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut* 66, 2069–2079. doi:10.1136/gutjnl-2016-312609

El Aidy, S. E., van Baarlen, P. V., Derrien, M., Lindenbergh-Kortleve, D. J., Hooiveld, G. J., Levenez, F., et al. (2012). Temporal and spatial interplay of microbiota and intestinal mucosa drive establishment of immune homeostasis in conventionalized mice. *Mucosal Immunol.* 5, 567–579. doi:10.1038/mi.2012.32

Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., et al. (2018). Frogs: Find, rapidly, OTUs with Galaxy solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294. doi:10.1093/bioinformatics/btx791

Freire, R., Ingano, L., Serena, G., Cetinbas, M., Anselmo, A., Sapone, A., et al. (2019). Human gut derived-organoids provide model to study gluten response and effects of microbiota-derived molecules in celiac disease. *Sci. Rep.* 9, 7029. doi:10.1038/s41598-019-43426-w

Frese, S. A., Parker, K., Calvert, C. C., and Mills, D. A. (2015). Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning. *Microbiome* 3, 28. doi:10.1186/s40168-015-0091-8

Gehart, H., and Clevers, H. (2019). Tales from the crypt: New insights into intestinal stem cells. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 19–34. doi:10.1038/s41575-018-0081-y

Gonzalez, L. M., Williamson, I., Piedrahita, J. A., Blikslager, A. T., and Magness, S.T. (2013). Cell lineage identification and stem cell culture in a porcine model for the study of intestinal epithelial regeneration. *PLOS ONE* 8, e66465. doi:10.1371/journal.pone.0066465

Gribble, F. M., and Reimann, F. (2016). Enteroendocrine cells: Chemosensors in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 78, 277–299. doi:10.1146/annurev-physiol-021115-105439

Hansson, G. C. (2020). Mucins and the microbiome. *Annu. Rev. Biochem.* 89, 769–793. doi:10.1146/annurev-biochem-011520-105053

Hausmann, A., Russo, G., Grossmann, J., Zünd, M., Schwank, G., Aebersold, R., et al. (2020). Germ-free and microbiota-associated mice yield small intestinal epithelial organoids with equivalent and robust transcriptome/proteome expression phenotypes. *Cell. Microbiol.* 22, e13191. doi:10.1111/cmi.13191

Heinritz, S. N., Mosenthin, R., and Weiss, E. (2013). Use of pigs as a potential model for research into dietary modulation of the human gut microbiota. *Nutr. Res. Rev.* 26, 191–209. doi:10.1017/S0954422413000152

Henning, S. J. (1985). Ontogeny of enzymes in the small intestine. *Annu. Rev. Physiol.* 47, 231–245. doi:10.1146/annurev.ph.47.030185.001311

Heppert, J. K., Davison, J. M., Kelly, C., Mercado, G. P., Lickwar, C. R., and Rawls, J. F. (2021). Transcriptional programmes underlying cellular identity and microbial responsiveness in the intestinal epithelium. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 7–23. doi:10.1038/s41575-020-00357-6

Holman, D. B., Brunelle, B. W., Trachsel, J., and Allen, H. K. (2017). Meta-analysis to define a core microbiota in the swine gut. *mSystems* 2. doi:10.1128/mSystems.00004-17

Hooper, L. V. (2004). Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends Microbiol.* 12, 129–134. doi:10.1016/j.tim.2004.01.001

Howell, K. J., Kraiczy, J., Nayak, K. M., Gasparetto, M., Ross, A., Lee, C., et al. (2018). DNA methylation and transcription patterns in intestinal epithelial cells from pediatric patients with inflammatory bowel diseases differentiate disease subtypes and associate with outcome. *Gastroenterology* 154, 585–598. doi:10.1053/j.gastro.2017.10.007

In, J. G., Foulke-Abel, J., Estes, M. K., Zachos, N. C., Kovbasnjuk, O., and Donowitz, M. (2016). Human mini-guts: New insights into intestinal physiology and host-pathogen interactions. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 633–642. doi:10.1038/nrgastro.2016.142

Janeckova, L., Kostovcikova, K., Svec, J., Stastna, M., Strnad, H., Kolar, M., et al. (2019). Unique gene expression signatures in the intestinal mucosa and organoids derived from germ-free and monoassociated mice. *Ijms* 20, 1581. doi:10.3390/ijms20071581

Kayisoglu, O., Weiss, F., Niklas, C., Pierotti, I., Pompaiah, M., Wallaschek, N., et al. (2021). Location-specific cell identity rather than exposure to GI microbiota defines many innate immune signalling cascades in the gut epithelium. *Gut* 70, 687–697. doi:10.1136/gutjnl-2019-319919

Khalil, H. A., Lei, N. Y., Brinkley, G., Scott, A., Wang, J., Kar, U. K., et al. (2016). A novel culture system for adult porcine intestinal crypts. *Cell Tissue Res.* 365, 123–134. doi:10.1007/s00441-016-2367-0

Kozuka, K., He, Y., Koo-McCoy, S., Kumaraswamy, P., Nie, B., Shaw, K., et al. (2017). Development and characterization of a human and mouse intestinal epithelial cell monolayer platform. *Stem Cell Rep.* 9, 1976–1990. doi:10.1016/j.stemcr.2017.10.013

Kraiczy, J., Nayak, K. M., Howell, K. J., Ross, A., Forbester, J., Salvestrini, C., et al. (2019). DNA methylation defines regional identity of human intestinal epithelial organoids and undergoes dynamic changes during development. *Gut* 68, 49–61. doi:10.1136/gutjnl-2017-314817

Krautkramer, K. A., Dhillon, R. S., Denu, J. M., and Carey, H. V. (2017). Metabolic programming of the epigenome: Host and gut microbial metabolite interactions with host chromatin. *Transl. Res.* 189, 30–50. doi:10.1016/j.trsl.2017.08.005

Krautkramer, K. A., Kreznar, J. H., Romano, K. A., Vivas, E. I., Barrett-Wilt, G. A., Rabaglia,M. E., et al. (2016). Diet-microbiota interactions mediate global epigenetic programming in multiple host tissues. *Mol. Cell* 64, 982–992. doi:10.1016/j.molcel.2016.10.025

Larsson, E., Tremaroli, V., Lee, Y. S., Koren, O., Nookaew, I., Fricker, A., et al.(2012). Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88. *Gut* 61, 1124–1131. doi:10.1136/gutjnl-2011-301104

Lema, I., Araújo, J. R., Rolhion, N., and Demignot, S. (2020). Jejunum: The understudied meeting place of dietary lipids and the microbiota. *Biochimie* 178, 124–136. doi:10.1016/j.biochi.2020.09.007

McMurdie, P. J., and Holmes, S. (2013). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLOS ONE* 8, e61217. doi:10.1371/journal.pone.0061217

Merker, S. R., Weitz, J., and Stange, D. E. (2016). Gastrointestinal organoids: How they gut it out. *Dev. Biol.* 420, 239–250. doi:10.1016/j.ydbio.2016.08.010

Ménard, S., Fo€rster, V., Lotz, M., Gu€tle, D., Duerr, C. U., Gallo, R. L., et al. (2008). Developmental switch of intestinal antimicrobial peptide expression. *J. Exp. Med.* 205, 183–193. doi:10.1084/jem.20071022

Middendorp, S., Schneeberger, K., Wiegerinck, C. L., Mokry, M., Akkerman, R. D. L., Wijngaarden, S., et al. (2014). Adult stem cells in the small intestine are intrinsically programmed with their location-specific function. *STEM CELLS* 32, 1083–1091. doi:10.1002/stem.1655

Moeser, A. J., Pohl, C. S., and Rajput, M. (2017). Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. *Anim. Nutr.* 3, 313–321. doi:10.1016/j.aninu.2017.06.003

Mohammad, M. A., Didelija, I. C., Stoll, B., Burrin, D. G., and Marini, J. C. (2020). Modeling age-dependent developmental changes in the expression of genes involved in citrulline synthesis using pig enteroids. *Physiol. Rep.* 8, e14565. doi:10.14814/phy2.14565

Mohammadi, S., Morell-Perez, C., Wright, C. W., Wyche, T. P., White, C. H., Sana, T. R., et al. (2021). Assessing donor-to-donor variability in human intestinal organoid cultures. *Stem Cell Rep.* 16, 2364–2378. doi:10.1016/j.stemcr.2021.07.016

Navis, M., Martins Garcia, T., Renes, I. B., Vermeulen, J. L., Meisner, S., Wildenberg, M. E., et al. (2019). Mouse fetal intestinal organoids: New model to study epithelial maturation from suckling to weaning. *EMBO Rep.* 20. doi:10.15252/embr.201846221

Ozaka, S., Sonoda, A., Ariki, S., Kamiyama, N., Hidano, S., Sachi, N., et al. (2021). Protease inhibitory activity of secretory leukocyte protease inhibitor ameliorates murine experimental colitis by protecting the intestinal epithelial barrier. *Genes cells.* 26, 807–822. doi:10.1111/gtc.12888

Pan, W.-H., Sommer, F., Falk-Paulsen, M., Ulas, T., Best, P., Fazio, A., et al. (2018). Exposure to the gut microbiota drives distinct methylome and transcriptome changes in intestinal epithelial cells during postnatal development. *Genome Med.* 10, 27. doi:10.1186/s13073-018-0534-5

Pearce, S. C., Weber, G. J., van Sambeek, D. M., Soares, J. W., Racicot, K., and Breault, D. T. (2020). Intestinal enteroids recapitulate the effects of short-chain fatty acids on the intestinal epithelium. *PLoS One* 15, e0230231. doi:10.1371/journal.pone.0230231

Peterson, L. W., and Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 141–153. doi:10.1038/nri3608

Pié, S., Lallès, J. P., Blazy, F., Laffitte, J., Sève, B., and Oswald, I. P. (2004). Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J. Nutr.* 134, 641–647. doi:10.1093/jn/134.3.641

Price, A. E., Shamardani, K., Lugo, K. A., Deguine, J., Roberts, A. W., Lee, B. L., et al. (2018). A map of toll-like receptor expression in the intestinal epithelium reveals distinct spatial, cell type-specific, and temporal patterns. *Immunity* 49, 560–575. e6. doi:10.1016/j.immuni.2018.07.016

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., et al. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596. doi:10.1093/nar/gks1219

Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., and Lê Cao, K.-A. L. (2017). mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLoS Comput. Biol.* 13, e1005752. doi:10.1371/journal.pcbi.1005752

Sato, T., Stange, D. E., Ferrante, M., Vries, R. G. J., van Es, J. H., van den Brink, S., et al. (2011). Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and barrett's epithelium. *Gastroenterology* 141, 1762–1772. doi:10.1053/j.gastro.2011.07.050

Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., et al. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262–265. doi:10.1038/nature07935

Senger, S., Ingano, L., Freire, R., Anselmo, A., Zhu, W., Sadreyev, R., et al. (2018). Human fetal-derived enterospheres provide insights on intestinal development and a novel model to study necrotizing enterocolitis (NEC). *Cell. Mol. Gastroenterology Hepatology* 5, 549–568. doi:10.1016/j.jcmgh.2018.01.014

Sommer, F., and Bäckhed, F. (2015). The gut microbiota engages different signaling pathways to induce Duox2 expression in the ileum and colon epithelium. *Mucosal Immunol.* 8, 372–379. doi:10.1038/mi.2014.74

Thompson, C. A., DeLaForest, A., and Battle, M. A. (2018). Patterning the gastrointestinal epithelium to confer regional-specific functions. *Dev. Biol.* 435, 97–108. doi:10.1016/j.ydbio.2018.01.006

van der Hee, B., Madsen, O., Vervoort, J., Smidt, H., and Wells, J. M. (2020). Congruence of transcription programs in adult stem cell-derived jejunum organoids and original tissue during long-term culture. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 375. doi:10.3389/fcell.2020.00375

Vergnolle, N. (2016). Protease inhibition as new therapeutic strategy for GI diseases. *Gut* 65, 1215–1224. doi:10.1136/gutjnl-2015-309147

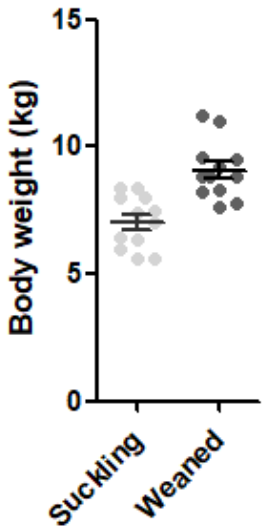
Verschuren, L. M. G., Calus, M. P. L., Jansman, A. J. M., Bergsma, R., Knol, E. F., Gilbert, H., et al. (2018). Fecal microbial composition associated with variation in feed efficiency in pigs depends on diet and sex1. *J. Animal Sci.* 96, 1405–1418. doi:10.1093/jas/sky060

Yu, D.-H., Gadkari, M., Zhou, Q., Yu, S., Gao, N., Guan, Y., et al. (2015). Postnatal epigenetic regulation of intestinal stem cells requires DNA methylation and is guided by the microbiome. *Genome Biol.* 16, 211. doi:10.1186/s13059-015-0763-5

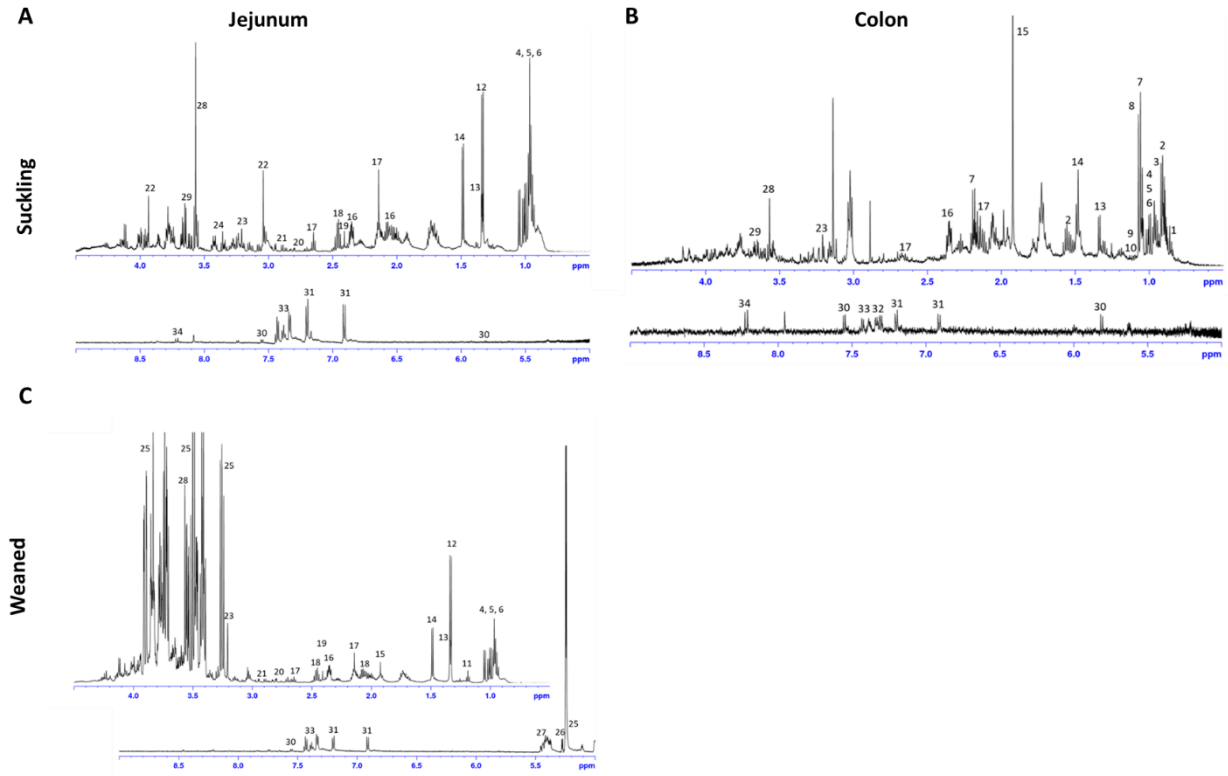
Zietek, T., Giesbertz, P., Ewers, M., Reichart, F., Weinmüller, M., Urbauer, E., et al. (2020). Organoids to study intestinal nutrient transport, drug uptake and metabolism – update to the human model and expansion of applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8. doi:10.3389/fbioe.2020.577656

Zietek, T., Rath, E., Haller, D., and Daniel, H. (2015). Intestinal organoids for assessing nutrient transport, sensing and incretin secretion. *Sci. Rep.* 5, 1–10. doi:10.1038/srep16831

Supplementary Data

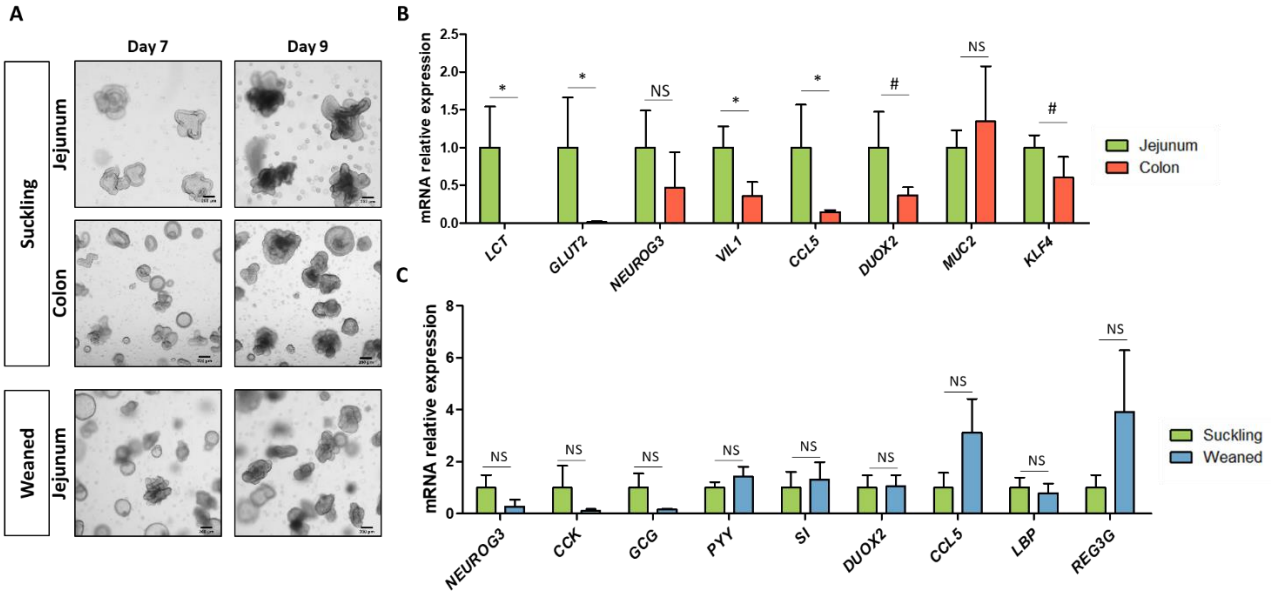


Supplementary Figure 1: Body weight of 21-day-old suckling piglets (n=12) and 35-day-old weaned piglets (n=12)

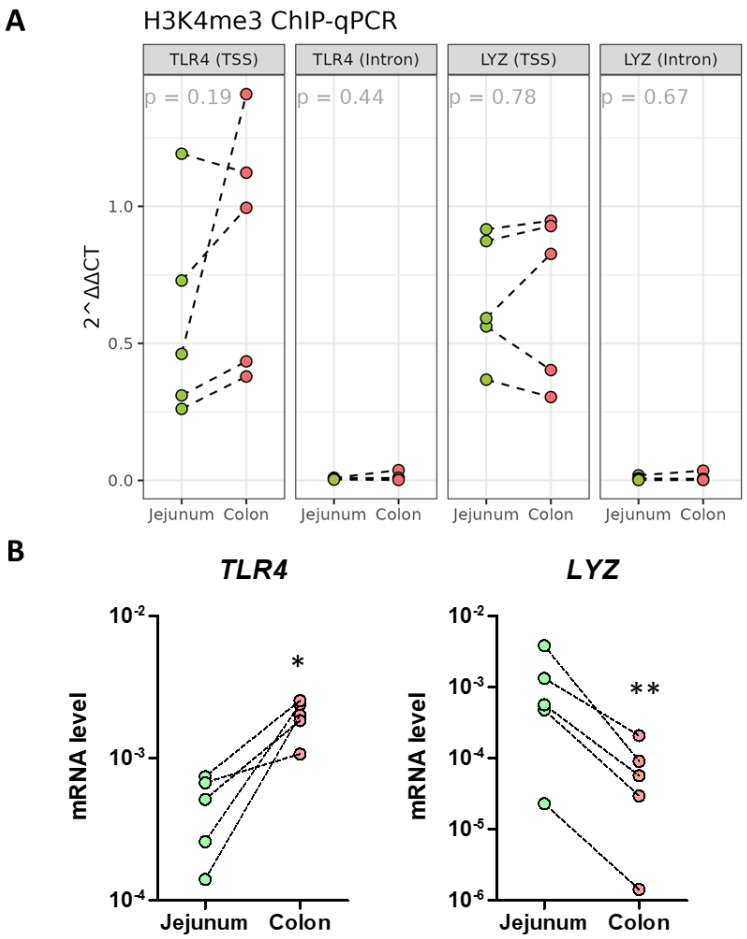


Supplementary Figure 2: Aliphatic region (δ^1H 4.5 – 0.5 ppm) and aromatic region (δ^1H 9 – 5 ppm) of a representative NMR spectrum of the jejunum content of 21-day-old suckling piglets (**A**), colon

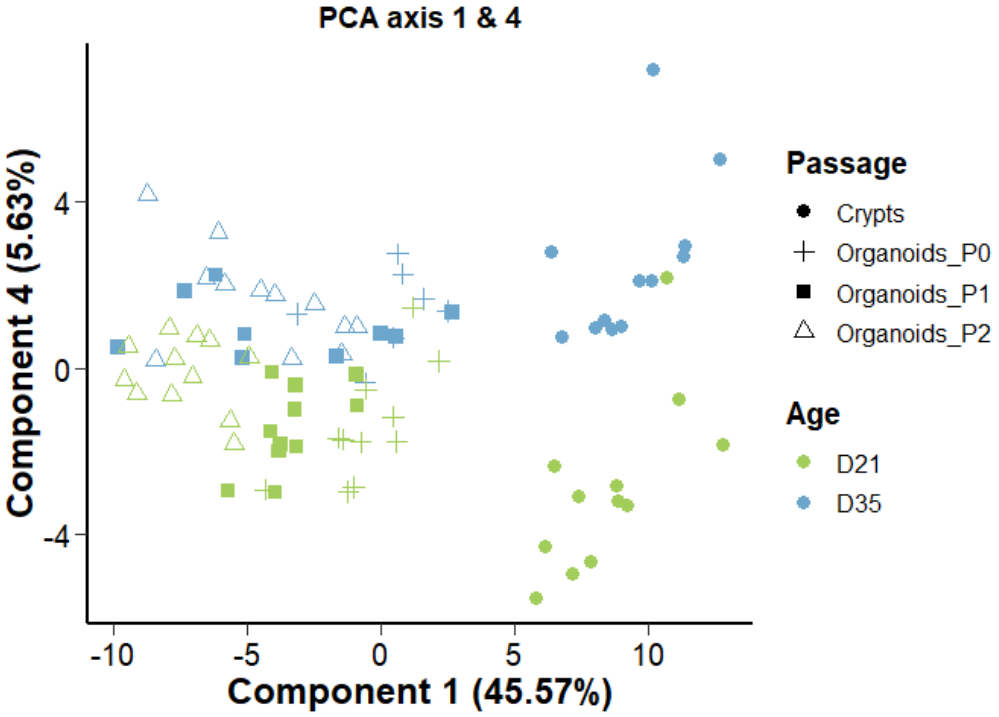
content of 21-day-old suckling piglets (**B**), jejunum content of 35-day-old weaned piglets (**C**). The numbers indicate identified metabolites described in supplementary table S2.



Supplementary Figure 3: Effects of differentiation on gene expression in piglet organoids. A. Representative images showing jejunum and colon organoids from 21-day-old suckling piglet and jejunum organoids from 35-day-old weaned piglets at day 7 (IntestiCult medium) and at day 9 (differentiation medium). The scale bar represents 200 µm. **B**. Gene expression in differentiated jejunum and colon organoids derived from 21-day-old suckling piglets (n=4 per group). **C**. Gene expression in differentiated jejunum organoids derived from 21-day-old sucking or 35-day-old weaned piglets (n=4 per group). *: significant difference in organoids in the same direction observed in crypts. #: significant difference in organoids in the opposite direction observed in crypts. NS: not significant.



Supplementary Figure 4: Epigenetic regulation of the regional expression of *TLR4* and *LYZ* in jejunum and colon organoids from suckling piglets. A. ChIP-qPCR was used to quantify the trimethylation of histone H3 lysine 4 (H3K4me3) in jejunum and colon organoids from 21-day-old suckling piglet (n=5 per group). H3K4me3 was analyzed in the promoter region (TSS) and intronic region of *TLR4* and *LYZ*. H3K4me3 in the TSS of the housekeeping gene HPRT was used for normalization. Numbers on the figure are piglet identifiers. The dotted lines link jejunum and colon samples from the same piglet. **B**. Log-10 transformed expression of *TLR4* and *LYZ* in the organoids used for ChIP-qPCR experiments (n=5 per group). Groups were compared with paired t-tests. *: p<0.05, **: p<0.01.



Supplementary Figure 5: Gene expression in jejunum organoids from 21-day-old suckling and 35-day-old weaned piglets. Principal component analysis (PCA) plot of the expression of 89 genes in jejunum crypts (n=12 suckling, n=11 weaned) and organoids at primary culture (n=11 suckling, n=7 weaned), passage 1 (n=11 suckling, n=9 weaned) and passage 2 (n=12 suckling, n=12 weaned). The axes 1 and 4 are presented.

Supplementary Tables

Table S1: List of oligonucleotides used for gene expression analysis using qPCR

Gene name		5'-3' sequence
ALPI	Foward	CGGAACCTGGTACAGGAGTG
ALPI	Reverse	GCCTCAAATTTCATGTCTGCCG
AQP8	Foward	GGCTTCTCTGTCACCGTGGA
AQP8	Reverse	AAAGAACCTGATGAGCCCTCCTA
ARG2	Foward	AGAGACGTGGACCCTCCTGA
ARG2	Reverse	GGATTGGCCTTTGTCTTTTGCC
ATOH1	Foward	TCGCTTTTCCGTCCCAACCT
ATOH1	Reverse	TCTTTTGCGCCATCATCGCC
BAX	Foward	TCAAGCGCATTGGAGATGAA
BAX	Reverse	TCATCCTCTGCAGCTCCATGT
CA1	Foward	TTCACTGGGGCAAGACAGATG
CA1	Reverse	AGCGCTGGAGTATTTCGCAG
CA2	Foward	ACGGCCACTCTTTCAACGTG
CA2	Reverse	CAGCAAGAGGTCCACCTTCCA
CCK	Foward	AAAGCACCTTCTGGCCGAGT
CCK	Reverse	GGTCACTTATTCTGTGGCTGGG
CCL20	Foward	GCTCCTGGCTGCTTTGATGTC
CCL20	Reverse	CATTGGCGAGCTGCTGTGTG
CCL5	Foward	CTCCATGGCAGCAGTCGT
CCL5	Reverse	AAGGCTTCCTCCATCCTAGC
CD14	Foward	GGGTTCCTGCTCAGATTCTG
CD14	Reverse	CCCACGACACATTACGGAGT
CDH1	Foward	TGGGCCGAGTGAGTTTTGAA
CDH1	Reverse	TGACTGTAACCACACCGTCG
CDX2	Foward	CGAAAGACAAATACCGAGTCGTG
CDX2	Reverse	CGGCCTTTCTCCGAATGGT
CELA2A	Foward	GGCGATGGCATCATTTCCAG
CELA2A	Reverse	GGACCCGAAGCTGACTATGC
CFTR	Foward	GTGGAGAGCATACCAACCGT
CFTR	Reverse	ACAACCAAACAAGCAGCCAC
CGN	Foward	GTTAAAGAGCTGTCCATCCAGATTG
CGN	Reverse	CTTAGCTGGTCTTTCTGGTCATTG
CHGA	Foward	CACTCCGAGGAGATGAACGGAT
CHGA	Reverse	TCTGCTGATGGGACCTCTCC
CLDN2	Foward	CAGCATGAAATTTGAGATCGGA
CLDN2	Reverse	GAGGAAATGATGCCCAAGTAGAGA
CLDN3	Foward	CCCTCATCGTCGTCGCCAT
CLDN3	Reverse	TACGTAGTCCTTGCGGTCGT
DEFB1	Foward	CAGGATTGAAGGGACCTGTT
DEFB1	Reverse	CTTCACTTGGCCTGTGTGTC

Gene name		5'-3' sequence
DPP4	Foward	TACCAAATCGTTCCTCCGGC
DPP4	Reverse	TCTGTTACCCATGTCACGCC
DUOX2	Foward	AGCTCTGCTGACTGTACCCCT
DUOX2	Reverse	CATAGCGCTGCACTTCCCAA
DUOXA2	Foward	CTGGTGTTCTTGGCCTTAGC
DUOXA2	Reverse	ACTCTCACCAACCAGAACCAG
F10	Foward	AGGCTTCGAAGGCAAAAACTG
F10	Reverse	AACTGGTCACAGTCTCCGTTG
F2R	Foward	GCTCTTTGTGTCCGTGCTTC
F2R	Reverse	ATGTTACCGTAGAAGGCGGC
F2RL1	Foward	GCAACAACTGGGTTTACGGG
F2RL1	Reverse	CCCAGTACCTCTGAACGCTG
F5	Foward	AGGTGAAACGTGATGACCCC
F5	Reverse	ATGCTCTCAGGCACATAGCC
FABP1	Foward	AGTTCACCTTGGGAGAGGAGT
FABP1	Reverse	CACCTTCCAACTGAACCACTG
FABP2	Foward	TCGGGATGAAATGGTCCAGACT
FABP2	Reverse	TGTGTTCTGGGCTGTGCTCCA
FABP6	Foward	GGCAAGGAGTGCGACATAGA
FABP6	Reverse	GTAGTTGGGGCTGTTCACCA
FCGRT	Foward	TTCCTGCTCTACTCCTGTCCC
FCGRT	Reverse	TGCAGGTGAGCACGGAAAAG
GCG	Foward	GTGCAGTGGCTGATGAACACC
GCG	Reverse	TTCCTCTGGGAAATCTCGCCT
GLUT1	Foward	TGCTCATCAACCGCAATGA
GLUT1	Reverse	GTTCCGCGCAGCTTCTTC
GLUT2	Foward	CCAGGCCCCATCCCCTGGTT
GLUT2	Reverse	GCGGGTCCAGTTGCTGAATGC
GNLY	Foward	TTGTCGGAAGATAATCCAGAAGC
GNLY	Reverse	CTTCATCTTGTCACACACCCG
GPX1	Foward	CTGGTCTCCAGTGTGTCGCA
GPX1	Reverse	AGGGCTTCGATGTCAGGCTC
GPX2	Foward	TACGCTCACACCACTCTGCC
GPX2	Reverse	CCTCAGAGCGAGGCCACATT
HES1	Foward	GCACAGAAAGTCATCAAAGCCCA
HES1	Reverse	CGGAGGTGCTCCACTGTCAT
IL18	Foward	CGTGTTTGAGGATATGCCTGATT
IL18	Reverse	TGGTTACTGCCAGACCTCTAGTGA
IL8	Foward	TTGCCAGAGAAATCACAGGA
IL8	Reverse	TGCATGGGACACTGGAAATA
KLF4	Foward	CCCCACCATGGGCCAAACTA

KLF4	Reverse	TGGCATGAGCTCTTGGTAATGGA
Gene name		**5'-3' sequence**
KRT20	Foward	CGGCTCAAATATGAGACTGAGCG
KRT20	Reverse	AGCGCGTAGACTCTGCACTT
LBP	Foward	CCCAAGGTCAATGATAAGTTGG
LBP	Reverse	ATCTGGAGAACAGGGTCGTG
LCT	Foward	CACTCAAAGCTGTGCAGGAC
LCT	Reverse	GGATCCTTGGCAGAGAAGTG
LGR5	Foward	CCTTGGCCCTGAACAAAATA
LGR5	Reverse	ATTTCTTTCCCAGGGAGTGG
LYZ	Foward	GCAGTTAATGCCTGTCACATATCC
LYZ	Reverse	GAGGTCATCGTCCAGCAAAAC
MEP1B	Foward	GTCGCGATCTGACCGAGATG
MEP1B	Reverse	GGGAACATTCAGGGAATCCG
MKI67	Foward	TGCCCCACAAACCAATGGAC
MKI67	Reverse	TGAAAAAGTGGAGGCACACG
MUC1	Foward	GTCGCCCTGGCCATCATCTA
MUC1	Reverse	GTGGTAGGTGGGGTACTCGC
MUC13	Foward	CAAGTGACTTTACAGAATATATCCAGCA
MUC13	Reverse	GCCTCTTACATCCATAATAATCACACC
MUC2	Foward	TGCGCCTGGGCCGAGTACATGGC
MUC2	Reverse	GCTCCACCATCTCCGTCGTCAG
MYD88	Foward	CCATTCGAGATGACCCCCTGG
MYD88	Reverse	GCCGGATCATCTCCTGCACA
NEUROG3	Foward	CTGTCCAAGTGACCCACCAG
NEUROG3	Reverse	TTCCCCGGTACGCGAGTG
NFKB1	Foward	TCGCTGCCAAAGAAGGACAT
NFKB1	Reverse	AGCGTTCAGACCTTCACCGT
NFKB2	Foward	ACCAGCGTCATTGAGCAGATAG
NFKB2	Reverse	CCCGTGATGACTGCCAAGT
NHE3	Foward	GAACACAGCCTTTGTGCTCC
NHE3	Reverse	CACCTGGTCTATGATCTCCAGC
NLRP6	Foward	AGCTGCAGACTGGCCATTAG
NLRP6	Reverse	GGGGTTTTCTCACAGTGGCT
NOX1	Foward	TCCTGACTCCCATTGCAAGC
NOX1	Reverse	AATCACAACCTTTTGCCGGG
NR1H4	Foward	ATGGGAATGTTGGCTGAATGT
NR1H4	Reverse	TGTTGAGGTCACTTGTCGCA
OCLN	Foward	AGCTGGAGGAAGACTGGATCAG
OCLN	Reverse	TGCAGGCCACTGTCAAAATT
OLMF4	Foward	GTCAGCAAACCGGCTATTGT
OLMF4	Reverse	TGCCTTGGCCATAGGAAATA
PCNA	Foward	GTTGATAAAGAGGAGGAAGCAGTT
PCNA	Reverse	TGGCTTTTGTAAAGAAGTTCAGGTAC
PEPT1	Foward	GGATAGCCTGTACCCCAAGCT
PEPT1	Reverse	CATCCTCCACGTGCTTCTTGA
Gene name		**5'-3' sequence**
PI3	Foward	TGGTGGTATTCCTCATCTGCG
PI3	Reverse	TCTTTACCTCTCACCGGACC
PIGR	Foward	AGCTCATGACAACGCGGGAG
PIGR	Reverse	TTGGATGACCTTTTCGCCCTCT
PRSS2	Foward	GCGTCAACTACCCTGAGCTG
PRSS2	Reverse	GGTATGAGGCTTCACACTCGG
PTGS2	Foward	AGGCTGATACTGATAGGAGAAACG
PTGS2	Reverse	GCAGCTCTGGGTCAAACTTC
PYY	Foward	CGGCAGAGGTATGGGAAACGTG
PYY	Reverse	CCATAGGTAGGCGCCTTCTGG
REG3G	Foward	CTCCTGTCTCAGGTCCAA
REG3G	Reverse	GGTGTTATAAACAAGGCATAGC
REG4	Foward	AGCTGTGCTACTGGATGGTT
REG4	Reverse	ATGGATGCCAGGTGAGTTCC
RELA	Foward	CGAGAGGAGCACGGATACCA
RELA	Reverse	GCCCCGTGTAGCCATTGA
RETNLB	Foward	CAAAAACTCAGGCAAACTGTCTTC
RETNLB	Reverse	CACAGGCATAGCCACAAGCA
RPL32	Foward	TGCTCTCAGACCCCTTGTGAAG
RPL32	Reverse	TTTCCGCCAGTTCCGCTTA
SI	Foward	AGAAACTTGCCAGTGGAGCA
SI	Reverse	TCCTGGCCATACCTCTCCAA
SLC5A1	Foward	TCACCAAGCCCATTCCAGATG
SLC5A1	Reverse	GCTTCTTGAATGTCCTCCTCCT
SLPI	Foward	ATGTTGCCGAGATACTTGCG
SLPI	Reverse	GGCTGTCTGTCTTGCAGTG
SMOC2	Foward	GCACGTCCACCAGGTACGAA
SMOC2	Reverse	GCGTCCAACACACTCGTCAG
SOD1	Foward	TACACAAGGCTGTACCAGTGC
SOD1	Reverse	ACATTGCCCAGGTCTCCAAC
SOD2	Foward	AGTACCAGGAGGCGCTGAAA
SOD2	Reverse	GCAGAGCTACCTGAGCTGTAACATC
SOX9	Foward	AAGCTGGCGGATCAGTACCC
SOX9	Reverse	TGGCCGTTCTTCACCGACTT
SPDEF	Foward	CTGTGTGCCATGTCGGAGGA
SPDEF	Reverse	GCTGGTTGAGGCGCAGTAGT
ST14	Foward	TGTATGACACCCTAAGCCCC
ST14	Reverse	GTAGGAAGGAGGGTAGGTGC
TFF3	Foward	CAGAACCTGCCCGTGACCAT
TFF3	Reverse	AGGGACGGCACACTGGTTC
TJP1	Foward	AGGCGATGTTGTATTGAAGATAAATG

TJP1	Reverse	TTTTTGCATCCGTCAATGACA
TJP2	Foward	GCAAGCAGACGCTCATCAAC
TJP2	Reverse	TCAGAATACTGCTGCCGTCTC
Gene name		**5'-3' sequence**
TJP3	Foward	GGACATGCAAATGCGACCC
TJP3	Reverse	ATCTGACTGCCCAGTTTGACC
TLR2	Foward	TGACTGCACCCTTAACGGAC
TLR2	Reverse	TGTCTCCACATTACCGAGGG
TLR4	Foward	TCACTACAGAGACTTCATTCCCG
TLR4	Reverse	GGTCTGGGCAATCTCATACTCAA
TLR5	Foward	ACAGCGGACACCACAAGGAA
TLR5	Reverse	ATGTGGTGGGCGAGAACCAA
Gene name		**5'-3' sequence**
TNFSF13	Foward	TCTGGGAGCAGGAACAGAGC
TNFSF13	Reverse	TCTCCCACGCTTGAGAGCTG
TNFSF13B	Foward	CGGAGGAGACAGTCACTCAGGA
TNFSF13B	Reverse	AGCTGAGAAGCCATGGAACAA
VIL1	Foward	GTTGTGGGAGTCACCCTCTG
VIL1	Reverse	GTGCTGACTTGGCCATACCT

Table S2: Metabolites identified by NMR metabolomics in the jejunum (J) and colon (C) content of 21-day-old suckling and 35-day-old weaned piglets. "*" indicates the peak used for quantification based on the corresponding bucket intensity (not overlapping with peaks from other metabolites). Multiplicity of signals is indicated within brackets: s, singlet; d, doublet; t, triplet; m, multiplet.

#	Metabolite	Segment	δ1H (ppm)
1	2-methylbutyrate	C	0.86 (t)*
2	Butyrate	C	0.90 (t)*, 1.56 (m), 2.16 (t)
3	Isovalerate	C	0.92 (d)*, 2.06 (d)
4	Isoleucine	J, C	0.94 (t)*, 1.01 (d)
5	Leucine	J, C	0.97 (t)*
6	Valine	J, C	1.00 (d)*, 1.05 (d)
7	Propionate	C	1.06 (t)*, 2.19 (m)
8	Isobutyrate	C	1.07 (d)*, 2.39 (m)
9	3-methyl-2-oxovalerate	C	1.10 (d)*
10	3-methyl-2-oxobutyrate	C	1.13 (d)*
11	Ethanol	J, C	1.19 (t)*, 3.66 (m)
12	Lactate	J, C	1.33 (d), 4.12 (m)*
13	Threonine	J, C	1.34 (d), 4.26 (m)*
14	Alanine	J, C	1.49 (d)*
15	Acetate	J, C	1.92 (s)*
16	Glutamate	J, C	2.07 (m), 2.13 (m), 2.36 (m)*
17	Methionine	J, C	2.14 (s), 2.65 (t)*
18	Glutamine	J	2.15 (m), 2.46* (m)
19	Succinate	J, C	2.41 (s)*
20	Aspartate	J	2.68 (d), 2.71 (d)*, 2.80 (d), 2.83 (d)
21	Asparagine	J, C	2.87 (d), 2.89 (d), 2.95 (d)*, 2.97 (d)
22	Creatine	J	3.04 (s)*, 3.93 (s)
23	Choline	J, C	3.21 (s)*
24	Proline	J, C	3.35 (m)*, 4.14 (m)
25	Glucose	J, C	3.26 (m), 3.38 - 3.56 (multiple signals), 3.69 - 3.92 (multiple signals), 5.24 (d)*
26	Galactose	J, C	5.27 (d)*
27	Maltose	J	5.42 (d)*
28	Glycine	J, C	3.57 (s)*
29	Glycerol	J, C	3.55 (d), 3.57 (d), 3.65 (d)*, 3.67 (d)
30	Uracil	J, C	5.81 (d)*, 7.55 (d)
31	Tyrosine	J, C	6.91 (d)*, 7.20 (d)
32	Phenylacetate	C	7.31 (t)*, 7.39 (t)
33	Phenylalanine	J, C	7.34 (d), 7.38 (t), 7.43 (t)*
34	Hypoxanthine	J, C	8.21* (d)

J: Jejunum; C: Colon; *: peak used for quantification based on the corresponding bucket intensity, s: singlet; d: doublet; t: triplet; m: multiplet

Table S3: Relative concentration of metabolites in the jejunum and colon contents from 21-day-old suckling piglets

	P-Value		Mean			S.e.m	
Metabolite	**Non-adjusted**	**Adjusted**	**Jejunum**	**Colon**	**Log2(Fold-change)**	**Jejunum**	**Colon**
Isobutyrate	**0,000**	**0,001**	0,0005399	0,0043554	3,01	0,0001424	0,0011429
Acetate	**0,000**	**0,001**	0,0013323	0,0073961	2,47	0,0002042	0,0019480
Propionate	**0,002**	**0,005**	0,0021952	0,0083111	1,92	0,0005291	0,0021030
3-methyl-2-oxovalerate	**0,002**	**0,005**	0,0003675	0,0012778	1,80	0,0000767	0,0003143
Butyrate	**0,002**	**0,004**	0,0019111	0,0052288	1,45	0,0003675	0,0011355
Isovalerate	**0,001**	**0,004**	0,0014410	0,0037148	1,37	0,0002837	0,0007496
3-methyl-2-oxobutyrate	**0,009**	**0,016**	0,0003388	0,0008427	1,31	0,0000484	0,0002072
Phenylacetate	**0,000**	**0,000**	0,0004286	0,0005822	0,44	0,0000308	0,0000243
2-methylbutyrate	0,199	0,282	0,0014525	0,0018898	0,38	0,0002533	0,0002757
Isoleucine	0,343	0,416	0,0009131	0,0011817	0,37	0,0002276	0,0001844
Maltose	0,526	0,617	0,0016093	0,0017009	0,08	0,0000833	0,0001294
Glucose	0,862	0,862	0,0026382	0,0025969	-0,02	0,0002034	0,0001328
Succinate	0,832	0,857	0,0009703	0,0009105	-0,09	0,0001745	0,0001756
Aspartate	0,580	0,658	0,0003155	0,0002928	-0,11	0,0000334	0,0000261
Valine	0,762	0,809	0,0008113	0,0007483	-0,12	0,0001872	0,0000993
Uracil	0,212	0,288	0,0012900	0,0011650	-0,15	0,0000780	0,0000688
Galactose	0,303	0,382	0,0024978	0,0022426	-0,16	0,0001987	0,0001622
Hypoxantine	**0,011**	**0,018**	0,0005232	0,0004649	-0,17	0,0000220	0,0000200
Glutamate	0,626	0,687	0,0025291	0,0021935	-0,21	0,0006460	0,0002608
Threonine	0,243	0,317	0,0012125	0,0010452	-0,21	0,0001149	0,0001440
Ethanol	0,089	0,131	0,0006112	0,0005073	-0,27	0,0000663	0,0000386
Lactate	**0,003**	**0,006**	0,0017104	0,0012814	-0,42	0,0001343	0,0000861
Proline	**0,000**	**0,000**	0,0007000	0,0004472	-0,65	0,0000382	0,0000493
Phenylalanine	**0,001**	**0,004**	0,0009196	0,0005832	-0,66	0,0001034	0,0000288
Methionine	**0,000**	**0,000**	0,0004981	0,0003038	-0,71	0,0000399	0,0000198
Tyrosine	**0,001**	**0,002**	0,0010639	0,0006345	-0,75	0,0001237	0,0000405
Glutamine	**0,038**	0,061	0,0011280	0,0006085	-0,89	0,0002354	0,0000929
Creatine	**0,006**	**0,012**	0,0020658	0,0010619	-0,96	0,0003432	0,0001387
Alanine	0,059	0,092	0,0028646	0,0014367	-1,00	0,0007440	0,0001524
Glycerol	**0,000**	**0,000**	0,0021056	0,0010504	-1,00	0,0002404	0,0001941
Choline	**0,000**	**0,000**	0,0019984	0,0007904	-1,34	0,0002770	0,0001273
Asparagine	**0,000**	**0,000**	0,0008457	0,0003234	-1,39	0,0000655	0,0000547
Leucine	**0,009**	**0,016**	0,0055364	0,0018304	-1,60	0,0013961	0,0002166
Glycine	**0,000**	**0,001**	0,0110877	0,0017677	-2,65	0,0024707	0,0001905

Table S4: Relative abundance of bacterial phyla and families in the jejunum and colon contents from 21-day-old suckling piglets

	P-Value		Mean (%)		S.e.m	
	Non-adjusted	**Adjusted**	**Jejunum**	**Colon**	**Jejunum**	**Colon**
Phylum						
Firmicutes	**0,000**	**0,000**	88,47	67,65	6,91	3,13
Proteobacteria	0,848	0,848	5,05	1,31	2,36	0,33
Bacteroidota	**0,000**	**0,000**	3,75	28,03	3,51	3,11
Fusobacteriota	**0,004**	**0,006**	1,66	1,07	1,27	0,42
Actinobacteriota	0,383	0,459	0,71	0,37	0,38	0,10
Desulfobacterota	**0,000**	**0,000**	0,02	1,36	0,02	0,26
Family						
Lactobacillaceae	**0,000**	**0,000**	73,34	12,74	10,44	2,62
Peptostreptococcaceae	0,183	0,201	7,00	2,44	2,46	0,63
Pasteurellaceae	0,472	0,495	3,78	0,41	1,90	0,23
Streptococcaceae	**0,003**	**0,004**	3,59	0,10	2,57	0,03
Prevotellaceae	**0,000**	**0,000**	1,83	12,35	1,65	3,06
Bacteroidaceae	**0,000**	**0,000**	1,72	3,60	1,71	1,26
Clostridiaceae	**0,026**	**0,032**	1,66	4,14	0,70	1,84
Fusobacteriaceae	**0,001**	**0,002**	1,49	1,07	1,26	0,42
Enterobacteriaceae	**0,011**	**0,015**	0,88	0,84	0,71	0,33
Erysipelotrichaceae	0,883	0,883	0,71	0,25	0,53	0,07
Lachnospiraceae	**0,000**	**0,000**	0,70	14,57	0,37	1,51
Oscillospiraceae	**0,000**	**0,000**	0,29	12,66	0,26	1,38
Ruminococcaceae	**0,000**	**0,000**	0,09	9,30	0,05	2,05
Anaerovoracaceae	**0,000**	**0,000**	0,05	2,89	0,03	0,46
Desulfovibrionaceae	**0,000**	**0,000**	0,02	1,00	0,02	0,14
[Eubacterium] coprostanoligenes group	**0,000**	**0,000**	0,01	2,58	0,00	0,39
Rikenellaceae	**0,000**	**0,000**	0,01	3,42	0,01	0,82
Tannerellaceae	**0,000**	**0,000**	0,01	0,83	0,01	0,25
Christensenellaceae	**0,000**	**0,000**	0,00	3,80	0,00	1,27
Muribaculaceae	**0,000**	**0,000**	0,00	4,03	0,00	1,88
p-2534-18B5 gut group	**0,000**	**0,000**	0,00	2,31	0,00	0,77
Paludibacteraceae	**0,036**	**0,042**	0,00	0,91	0,00	0,83

Table S5: Relative expression of mRNA in the jejunum and colon crypts and organoids from 21-day-old suckling piglets (1/4)

	Crypts			Organoids P0			Organoids P1			Organoids P2		
	P-Value			P-Value			P-Value			P-Value		
Gene	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)
CA1	**0,000**	**0,000**	15,04	**0,000**	**0,000**	7,70	**0,000**	**0,000**	4,41	**0,000**	**0,000**	5,57
PI3	**0,000**	**0,000**	9,95	**0,000**	**0,000**	9,58	**0,000**	**0,000**	8,76	**0,000**	**0,000**	11,33
NOX1	**0,000**	**0,000**	7,97	**0,000**	**0,000**	3,20	**0,000**	**0,000**	4,64	**0,000**	**0,000**	6,78
DUOXA2	**0,000**	**0,000**	6,93	**0,001**	**0,002**	-2,32	**0,000**	**0,000**	-2,54	0,903	0,903	0,41
DUOX2	**0,000**	**0,000**	6,73	**0,000**	**0,000**	-2,03	**0,000**	**0,000**	-2,31	0,089	0,135	0,05
CA2	**0,000**	**0,000**	6,01	**0,000**	**0,000**	2,44	0,107	0,121	0,73	**0,000**	**0,000**	2,03
MUC1	**0,000**	**0,000**	5,58	**0,000**	**0,000**	4,35	**0,000**	**0,000**	1,81	**0,000**	**0,000**	2,06
DEFB1	**0,000**	**0,000**	5,50	**0,000**	**0,000**	7,64	**0,000**	**0,000**	7,39	**0,000**	**0,000**	7,69
PTGS2	**0,000**	**0,000**	5,19	**0,000**	**0,000**	4,37	**0,000**	**0,000**	3,43	**0,000**	**0,000**	3,89
TLR2	**0,000**	**0,000**	4,44	**0,000**	**0,000**	2,48	**0,000**	**0,000**	2,29	**0,000**	**0,000**	2,75
TLR4	**0,000**	**0,000**	3,88	**0,000**	**0,000**	7,38	**0,000**	**0,000**	6,46	**0,000**	**0,000**	5,81
SLPI	**0,000**	**0,000**	3,39	**0,000**	**0,000**	6,58	**0,000**	**0,000**	5,05	**0,000**	**0,000**	7,29
GPX2	**0,000**	**0,000**	3,08	**0,001**	**0,002**	0,93	0,349	0,375	0,40	**0,000**	**0,000**	1,99
GLUT1	**0,000**	**0,000**	3,07	**0,025**	**0,036**	0,38	**0,009**	**0,012**	-0,46	**0,002**	**0,003**	-0,47
F2R	**0,000**	**0,000**	2,89	0,577	0,677	-0,20	0,831	0,841	-0,01	**0,022**	**0,037**	0,48
SPDEF	**0,000**	**0,000**	2,47	0,595	0,688	-0,60	**0,000**	**0,000**	-2,23	**0,001**	**0,001**	-1,16
AQP8	**0,000**	**0,000**	2,42	**0,000**	**0,000**	5,11	0,062	0,074	0,18	**0,000**	**0,000**	3,97
MUC2	**0,000**	**0,000**	2,40	0,898	0,924	-0,25	0,918	0,918	-0,34	0,837	0,865	-0,05
KLF4	**0,000**	**0,000**	2,13	0,899	0,924	-0,27	0,743	0,760	-0,06	0,055	0,085	0,36
ATOH1	**0,000**	**0,000**	1,90	**0,000**	**0,000**	-1,71	**0,000**	**0,000**	-2,91	**0,001**	**0,003**	-0,95
SOX9	**0,006**	**0,010**	0,77	**0,000**	**0,000**	-1,10	**0,000**	**0,000**	-2,10	**0,009**	**0,015**	-0,67
REG4	0,115	0,158	0,75	**0,000**	**0,000**	-1,94	**0,000**	**0,000**	-1,58	**0,008**	**0,014**	-0,52
GPX1	**0,000**	**0,000**	0,74	**0,000**	**0,000**	1,40	**0,002**	**0,003**	0,42	**0,000**	**0,000**	1,13
CDH1	**0,000**	**0,000**	0,73	0,346	0,453	-0,16	**0,001**	**0,001**	-0,33	0,283	0,376	-0,11
TJP3	**0,000**	**0,000**	0,65	0,846	0,896	0,07	**0,021**	**0,025**	-0,41	**0,001**	**0,002**	0,51

Table S5: Relative expression of mRNA in the jejunum and colon crypts and organoids from 21-day-old suckling piglets (2/4)

	Crypts			Organoids P0			Organoids P1			Organoids P2		
	P-Value			P-Value			P-Value			P-Value		
Gene	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)
NFKB2	**0,007**	**0,013**	0,63	0,475	0,586	-0,20	**0,001**	**0,001**	-0,58	0,425	0,540	0,20
TNFSF13	**0,003**	**0,006**	0,62	0,365	0,470	0,21	**0,000**	**0,000**	-0,81	**0,046**	0,071	0,23
LGR5	**0,021**	**0,033**	0,52	0,578	0,677	-0,31	0,438	0,458	0,25	**0,026**	**0,043**	2,63
CELA2A	0,571	0,635	0,40	**0,000**	**0,000**	0,38	**0,037**	**0,045**	-0,17	**0,000**	**0,000**	1,01
ST14	**0,010**	**0,016**	0,31	0,795	0,853	0,06	**0,002**	**0,002**	-0,33	0,206	0,292	0,15
ARG2	0,695	0,746	0,29	0,695	0,773	-0,23	0,550	0,569	0,08	**0,000**	**0,000**	0,77
HES1	0,170	0,219	0,21	0,065	0,093	0,50	0,097	0,111	-0,30	**0,026**	**0,043**	0,47
BAX	0,279	0,350	0,14	0,646	0,737	-0,12	**0,000**	**0,000**	-0,46	**0,001**	**0,001**	0,36
CD14	0,133	0,179	0,09	**0,000**	**0,000**	-2,43	**0,000**	**0,000**	-2,62	**0,000**	**0,000**	-1,42
F5	0,632	0,690	0,07	**0,000**	**0,000**	-4,02	**0,000**	**0,000**	-2,92	**0,000**	**0,000**	-1,86
CLDN3	0,365	0,444	0,03	**0,000**	**0,000**	-0,76	**0,000**	**0,000**	-1,40	**0,000**	**0,000**	-0,74
CCL20	**0,019**	**0,030**	0,01	0,417	0,522	-0,58	**0,000**	**0,000**	-0,92	**0,002**	**0,003**	-1,38
NHE3	0,449	0,526	0,01	**0,000**	**0,000**	-3,53	**0,000**	**0,000**	-6,28	**0,000**	**0,000**	-4,82
CGN	0,955	0,957	-0,05	0,286	0,380	-0,14	0,070	0,082	-0,28	0,788	0,825	0,00
F2RL1	0,399	0,473	-0,06	**0,005**	**0,007**	-1,11	**0,000**	**0,000**	-1,15	**0,015**	**0,025**	-0,59
CDX2	0,636	0,690	-0,07	**0,024**	**0,035**	-0,38	**0,000**	**0,000**	-0,83	**0,000**	**0,000**	-0,49
SOD2	0,792	0,839	-0,08	**0,000**	**0,000**	-1,38	**0,003**	**0,004**	-0,67	0,896	0,903	-0,01
SOD1	0,939	0,957	-0,08	**0,018**	**0,028**	-0,43	**0,000**	**0,000**	-0,65	0,226	0,315	-0,15
RELA	0,810	0,848	-0,11	0,388	0,493	-0,19	**0,000**	**0,000**	-1,00	0,702	0,761	0,04
TFF3	0,529	0,596	-0,13	0,077	0,109	-1,12	**0,000**	**0,000**	-2,06	**0,000**	**0,000**	-1,21
TJP1	0,381	0,459	-0,14	**0,000**	**0,000**	-0,83	**0,000**	**0,001**	-0,87	0,276	0,372	0,26
TJP2	**0,037**	0,054	-0,16	0,763	0,839	0,01	**0,002**	**0,003**	-0,48	0,561	0,649	-0,07
MYD88	0,334	0,413	-0,18	0,480	0,586	-0,16	0,075	0,087	-0,31	**0,000**	**0,000**	0,96
PYY	0,833	0,862	-0,24	**0,000**	**0,000**	-2,02	**0,018**	**0,023**	-1,53	0,750	0,798	0,72
OCLN	0,139	0,184	-0,24	**0,010**	**0,015**	-0,36	**0,002**	**0,002**	-0,53	0,594	0,664	0,07
FCGRT	0,159	0,208	-0,25	0,493	0,593	-0,14	**0,000**	**0,000**	-0,65	0,233	0,318	-0,08

Table S5: Relative expression of mRNA in the jejunum and colon crypts and organoids from 21-day-old suckling piglets (3/4)

	Crypts			Organoids P0			Organoids P1			Organoids P2		
	P-Value			P-Value			P-Value			P-Value		
Gene	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)
CFTR	0,200	0,254	-0,25	**0,000**	**0,000**	-1,76	**0,000**	**0,000**	-1,82	0,753	0,798	0,50
FABP6	**0,000**	**0,000**	-0,41	0,903	0,924	-0,06	**0,000**	**0,000**	-1,55	0,472	0,575	1,53
NFKB1	**0,038**	0,054	-0,41	**0,000**	**0,000**	-1,11	**0,000**	**0,000**	-0,85	0,184	0,264	0,27
DPP4	0,116	0,158	-0,45	0,780	0,847	0,16	0,365	0,386	0,52	0,419	0,540	-0,10
PCNA	0,089	0,125	-0,46	**0,000**	**0,000**	-1,28	**0,018**	**0,023**	-0,60	0,448	0,561	-0,04
IL18	0,957	0,957	-0,50	**0,000**	**0,000**	-1,87	**0,000**	**0,000**	-1,31	0,098	0,142	-0,25
TLR5	**0,000**	**0,000**	-0,56	**0,000**	**0,000**	-1,34	**0,000**	**0,000**	-1,36	0,300	0,392	-0,30
MUC13	0,471	0,544	-0,60	0,916	0,927	-0,28	**0,000**	**0,000**	-2,05	**0,000**	**0,000**	-1,43
CHGA	**0,033**	**0,048**	-0,63	**0,002**	**0,003**	-1,38	**0,000**	**0,000**	-3,39	**0,000**	**0,000**	-2,15
CLDN2	**0,000**	**0,001**	-0,69	**0,000**	**0,000**	-2,38	**0,000**	**0,000**	-2,70	**0,000**	**0,000**	-1,94
NEUROG3	**0,013**	**0,022**	-0,74	**0,000**	**0,000**	-4,16	**0,000**	**0,000**	-2,50	0,589	0,664	0,55
KRT20	**0,024**	**0,036**	-0,78	0,679	0,765	-0,26	**0,042**	0,051	-0,63	0,462	0,571	-0,23
OLFM4	**0,016**	**0,026**	-0,85	**0,000**	**0,000**	-5,70	**0,000**	**0,000**	-7,01	**0,000**	**0,000**	-6,24
VIL1	**0,000**	**0,000**	-1,04	0,099	0,134	-0,21	**0,001**	**0,001**	-0,67	0,846	0,865	-0,02
SLC5A1	0,488	0,557	-1,15	**0,000**	**0,001**	0,66	0,156	0,172	-0,66	**0,000**	**0,000**	1,09
MKI67	**0,000**	**0,000**	-1,20	**0,000**	**0,000**	-0,81	**0,000**	**0,000**	-1,09	0,523	0,620	-0,21
FABP1	**0,018**	**0,029**	-1,50	0,977	0,977	-0,62	**0,000**	**0,000**	-1,90	0,092	0,137	1,10
IL8	**0,000**	**0,000**	-1,53	**0,000**	**0,000**	-2,95	**0,000**	**0,000**	-4,23	**0,000**	**0,000**	-2,47
RETNLB	**0,000**	**0,000**	-1,62	**0,000**	**0,000**	-4,06	**0,000**	**0,000**	-2,63	**0,002**	**0,004**	-1,56
CCL5	**0,000**	**0,000**	-1,68	0,095	0,132	0,02	**0,000**	**0,000**	-2,63	**0,041**	0,065	-0,08
NR1H4	**0,000**	**0,000**	-1,79	0,096	0,132	-2,24	0,206	0,224	-1,54	0,546	0,639	-0,58
GCG	**0,000**	**0,000**	-1,82	**0,000**	**0,000**	-2,46	**0,000**	**0,000**	-3,89	**0,000**	**0,000**	-1,23
LBP	**0,000**	**0,000**	-2,01	**0,000**	**0,000**	-2,96	**0,000**	**0,000**	-2,58	**0,000**	**0,000**	-1,62
F10	**0,002**	**0,003**	-2,13	**0,000**	**0,000**	-1,69	**0,000**	**0,000**	-2,26	**0,000**	**0,000**	-2,16
SMOC2	**0,000**	**0,000**	-2,20	**0,000**	**0,000**	-1,06	**0,000**	**0,000**	-1,22	**0,000**	**0,000**	-0,61
MEP1B	**0,005**	**0,010**	-2,46	**0,000**	**0,000**	-2,35	**0,000**	**0,000**	-3,26	**0,000**	**0,000**	-2,78

Table S5: Relative expression of mRNA in the jejunum and colon crypts and organoids from 21-day-old suckling piglets (4/4)

	Crypts			**Organoids P0**			**Organoids P1**			**Organoids P2**		
	P-Value			**P-Value**			**P-Value**			**P-Value**		
Gene	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)
LYZ	**0,000**	**0,000**	-3,45	**0,000**	**0,000**	-7,74	**0,000**	**0,000**	-6,68	**0,000**	**0,000**	-4,75
PIGR	**0,000**	**0,000**	-3,55	**0,000**	**0,000**	-2,58	**0,000**	**0,000**	-3,42	**0,000**	**0,000**	-2,71
TNFSF13B	**0,000**	**0,000**	-3,62	**0,000**	**0,000**	-2,43	**0,000**	**0,000**	-2,11	0,507	0,610	-0,07
PEPT1	**0,000**	**0,000**	-4,22	**0,000**	**0,000**	-1,34	**0,000**	**0,000**	-1,79	**0,000**	**0,000**	-1,63
NLRP6	**0,000**	**0,000**	-4,80	**0,000**	**0,000**	-2,84	**0,000**	**0,000**	-2,86	**0,000**	**0,000**	-1,21
REG3G	**0,000**	**0,000**	-5,59	**0,000**	**0,000**	-6,99	**0,000**	**0,000**	-7,35	**0,000**	**0,000**	-2,42
SI	**0,000**	**0,000**	-6,92	**0,000**	**0,000**	-8,07	**0,000**	**0,000**	-5,71	**0,000**	**0,000**	-2,93
ALPI	**0,000**	**0,000**	-7,04	**0,000**	**0,000**	-7,72	**0,000**	**0,000**	-7,49	**0,000**	**0,000**	-7,67
GLUT2	**0,000**	**0,000**	-8,30	**0,001**	**0,002**	-2,72	0,136	0,151	-1,43	0,596	0,664	1,32
FABP2	**0,000**	**0,000**	-8,66	**0,000**	**0,000**	-6,60	**0,000**	**0,000**	-4,18	**0,003**	**0,006**	-1,29
CCK	**0,000**	**0,000**	-9,15	**0,000**	**0,000**	-8,31	**0,000**	**0,000**	-8,74	**0,000**	**0,000**	-7,05
LCT	**0,000**	**0,000**	-9,31	**0,000**	**0,000**	-3,14	**0,000**	**0,000**	-2,16	0,632	0,695	0,17

Table S6: Relative concentration of metabolites in the jejunum contents from 21-day-old suckling and 35-day-old weaned piglets

	P-Value		Mean			S.e.m	
Metabolite	**Non-adjusted**	**Adjusted**	**Suckling**	**Weaned**	**Log2(Fold-change)**	**Suckling**	**Weaned**
Glucose	**0,004**	**0,015**	0,0026382	0,0086391	1,71	0,0002034	0,0021760
Proline	**0,000**	**0,000**	0,0007000	0,0018804	1,43	0,0000382	0,0001678
Aspartate	**0,000**	**0,000**	0,0003155	0,0006974	1,14	0,0000334	0,0000560
Maltose	**0,004**	**0,015**	0,0016093	0,0024693	0,62	0,0000833	0,0002815
Choline	**0,024**	**0,037**	0,0019984	0,0027932	0,48	0,0002770	0,0002420
Methionine	**0,037**	0,053	0,0004981	0,0006729	0,43	0,0000399	0,0000480
Asparagine	**0,018**	**0,032**	0,0008457	0,0010813	0,35	0,0000655	0,0000737
Ethanol	0,354	0,401	0,0006112	0,0006969	0,19	0,0000663	0,0000653
Glycerol	0,453	0,491	0,0021056	0,0023142	0,14	0,0002404	0,0001633
Lactate	0,770	0,770	0,0017104	0,0017882	0,06	0,0001343	0,0002434
Galactose	0,633	0,658	0,0024978	0,0023858	-0,07	0,0001987	0,0001436
Uracil	**0,010**	**0,021**	0,0012900	0,0009949	-0,37	0,0000780	0,0000902
Glutamine	0,257	0,304	0,0011280	0,0008539	-0,40	0,0002354	0,0000919
Creatine	0,056	0,076	0,0020658	0,0014287	-0,53	0,0003432	0,0000571
Hypoxantine	**0,000**	**0,000**	0,0005232	0,0003618	-0,53	0,0000220	0,0000182
Phenylalanine	**0,006**	**0,017**	0,0009196	0,0006321	-0,54	0,0001034	0,0000346
Glutamate	0,162	0,200	0,0025291	0,0016246	-0,64	0,0006460	0,0001966
Tyrosine	**0,002**	**0,010**	0,0010639	0,0006712	-0,66	0,0001237	0,0000387
Acetate	**0,012**	**0,023**	0,0013323	0,0008324	-0,68	0,0002042	0,0000351
Threonine	**0,003**	**0,014**	0,0012125	0,0007320	-0,73	0,0001149	0,0000870
Alanine	0,065	0,084	0,0028646	0,0014677	-0,96	0,0007440	0,0002644
Succinate	**0,007**	**0,019**	0,0009703	0,0004786	-1,02	0,0001745	0,0000394
Glycine	**0,015**	**0,028**	0,0110877	0,0049245	-1,17	0,0024707	0,0009712
Leucine	**0,021**	**0,035**	0,0055364	0,0022572	-1,29	0,0013961	0,0005149
Isoleucine	**0,010**	**0,021**	0,0009131	0,0003431	-1,41	0,0002276	0,0000332
Valine	**0,004**	**0,015**	0,0008113	0,0002960	-1,45	0,0001872	0,0000226

Table S7: Relative abundance of bacterial phyla and families in the jejunum contents from 21-day-old suckling and 35-day-old weaned piglets

	P-Value		Mean (%)		S.e.m	
	Non-adjusted	**Adjusted**	**Suckling**	**Weaned**	**Suckling**	**Weaned**
Phylum						
Firmicutes	0,440	0,751	88,47	93,34	6,91	3,75
Proteobacteria	0,684	0,821	5,05	5,44	2,36	3,64
Bacteroidota	0,501	0,751	3,75	0,80	3,51	0,70
Fusobacteriota	0,088	0,531	1,66	0,08	1,27	0,08
Actinobacteriota	0,395	0,751	0,71	0,28	0,38	0,12
Desulfobacterota	0,996	0,996	0,02	0,02	0,02	0,02
Family						
Lactobacillaceae	0,251	0,460	73,34	84,89	10,44	6,92
Peptostreptococcaceae	**0,000**	**0,001**	7,00	2,23	2,46	2,18
Pasteurellaceae	0,305	0,480	3,78	1,82	1,90	1,76
Streptococcaceae	0,478	0,546	3,59	2,86	2,57	1,22
Prevotellaceae	0,484	0,546	1,83	0,24	1,65	0,18
Bacteroidaceae	0,206	0,453	1,72	0,01	1,71	0,00
Clostridiaceae	0,183	0,453	1,66	1,78	0,70	1,18
Fusobacteriaceae	0,106	0,388	1,49	0,06	1,26	0,05
Enterobacteriaceae	0,764	0,764	0,88	3,48	0,71	3,32
Erysipelotrichaceae	**0,042**	0,230	0,71	0,58	0,53	0,57
Lachnospiraceae	0,497	0,546	0,70	0,50	0,37	0,16

Table S8: Relative expression of mRNA in the jejunum crypts and organoids from 21-day-old suckling and 35-day-old weaned piglets (1/4)

	Crypts			Organoids P0			Organoids P1			Organoids P2		
	P-Value			P-Value			P-Value			P-Value		
Gene	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)
PI3	**0,000**	**0,000**	5,53	**0,000**	**0,000**	3,29	0,371	0,661	1,51	0,288	0,471	2,63
NOX1	**0,000**	**0,000**	3,80	0,285	0,566	-2,14	**0,032**	0,291	-2,20	**0,048**	0,119	1,96
DUOXA2	**0,010**	**0,034**	3,06	**0,039**	0,244	0,94	0,665	0,886	1,67	0,272	0,471	2,24
DUOX2	**0,000**	**0,000**	2,08	0,084	0,394	0,68	0,646	0,885	1,11	0,555	0,716	0,75
REG3G	**0,000**	**0,000**	1,85	**0,032**	0,238	2,26	0,217	0,607	2,52	0,401	0,604	2,70
IL18	0,073	0,152	1,50	0,767	0,875	-0,21	**0,028**	0,291	1,14	**0,018**	0,052	1,11
ARG2	**0,000**	**0,000**	1,47	0,208	0,501	-0,63	0,176	0,606	-0,74	**0,022**	0,063	1,12
SLPI	**0,005**	**0,018**	1,28	**0,000**	**0,000**	1,81	**0,000**	**0,003**	1,80	**0,011**	**0,039**	2,90
CCL5	**0,003**	**0,012**	1,23	0,957	0,970	1,57	0,676	0,886	0,09	0,438	0,618	1,03
GPX2	**0,000**	**0,000**	1,14	0,471	0,732	0,19	0,385	0,664	-0,09	**0,002**	**0,009**	1,90
SI	**0,012**	**0,038**	1,14	0,434	0,732	1,05	0,964	0,986	1,56	0,607	0,730	2,01
KRT20	0,055	0,126	1,07	0,392	0,698	1,07	0,262	0,613	1,06	0,627	0,744	0,20
F2R	**0,007**	**0,024**	0,97	0,495	0,732	-0,23	0,253	0,612	-0,27	0,393	0,604	0,61
PTGS2	0,785	0,842	0,93	0,172	0,450	0,58	0,537	0,818	-0,64	0,408	0,606	-1,73
PIGR	**0,012**	**0,038**	0,85	**0,001**	**0,038**	1,32	0,792	0,892	0,37	**0,000**	**0,000**	2,39
MUC2	**0,021**	0,057	0,82	0,410	0,715	0,85	0,998	0,998	0,66	0,286	0,471	0,10
AQP8	0,155	0,300	0,75	**0,041**	0,244	2,71	0,405	0,664	-2,29	**0,004**	**0,017**	3,70
BAX	**0,001**	**0,004**	0,66	0,066	0,343	0,33	0,353	0,661	0,27	**0,000**	**0,000**	0,94
LYZ	**0,049**	0,118	0,63	0,240	0,534	0,19	0,236	0,607	0,68	0,429	0,616	0,98
NR1H4	0,280	0,471	0,60	0,698	0,851	0,60	0,179	0,606	1,07	0,164	0,310	1,44
VIL1	0,203	0,361	0,56	0,293	0,566	0,18	0,806	0,897	0,24	**0,000**	**0,000**	0,73
GLUT1	**0,020**	0,055	0,54	0,182	0,456	0,54	0,212	0,607	-0,29	0,050	0,119	-0,49
CGN	**0,002**	**0,010**	0,53	0,631	0,795	0,09	0,108	0,457	0,30	**0,000**	**0,000**	0,60
DEFB1	0,740	0,823	0,53	0,749	0,875	0,31	0,191	0,606	0,73	**0,002**	**0,009**	3,36
IL8	0,104	0,206	0,51	0,597	0,795	0,02	**0,030**	0,291	1,26	**0,011**	**0,039**	0,95
TJP2	0,101	0,204	0,46	0,619	0,795	0,09	0,764	0,892	0,22	0,602	0,730	0,28

Table S8: Relative expression of mRNA in the jejunum crypts and organoids from 21-day-old suckling and 35-day-old weaned piglets (2/4)

	Crypts			Organoids P0			Organoids P1			Organoids P2		
	P-Value			P-Value			P-Value			P-Value		
Gene	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)
TNFSF13B	0,280	0,471	0,45	0,497	0,732	0,32	0,603	0,838	-0,18	0,232	0,413	1,70
NLRP6	0,192	0,349	0,44	0,132	0,409	0,46	0,423	0,672	-0,07	0,762	0,858	0,31
ST14	**0,007**	**0,024**	0,37	0,834	0,894	0,01	0,773	0,892	-0,05	**0,013**	**0,045**	0,83
DPP4	0,495	0,668	0,35	0,656	0,811	0,56	0,683	0,886	0,32	0,523	0,694	-0,32
ATOH1	0,491	0,668	0,32	0,097	0,394	-0,54	0,239	0,607	0,39	0,836	0,896	1,49
SLC5A1	0,057	0,126	0,31	0,121	0,398	0,74	0,357	0,661	-0,03	**0,000**	**0,001**	1,20
TJP3	0,161	0,305	0,29	**0,041**	0,244	0,47	0,325	0,661	-0,17	**0,000**	**0,000**	1,29
CD14	0,051	0,119	0,28	0,930	0,962	-0,29	0,275	0,629	-0,32	**0,038**	0,101	1,50
PEPT1	**0,018**	0,053	0,27	**0,007**	0,121	1,04	0,948	0,986	0,32	0,378	0,602	-0,04
TLR4	0,448	0,643	0,25	0,775	0,875	-0,20	0,398	0,664	0,09	0,228	0,413	0,83
FABP2	0,665	0,794	0,25	0,899	0,941	0,55	0,551	0,818	-0,15	0,579	0,726	1,22
GPX1	0,294	0,485	0,24	0,235	0,534	0,40	0,579	0,818	-0,15	**0,015**	**0,047**	0,66
TLR5	0,565	0,691	0,24	0,108	0,394	-0,37	0,229	0,607	-0,23	**0,001**	**0,004**	0,80
MUC13	0,256	0,446	0,20	0,268	0,566	0,75	0,333	0,661	1,19	0,775	0,862	0,09
CDH1	0,307	0,496	0,17	0,284	0,566	-0,19	0,979	0,991	0,18	0,522	0,694	0,15
MYD88	0,476	0,661	0,16	0,368	0,674	-0,30	0,119	0,482	-0,43	**0,024**	0,067	0,82
TLR2	0,468	0,660	0,15	0,794	0,883	0,10	0,410	0,664	1,42	0,803	0,882	1,20
SOD2	0,737	0,823	0,14	0,556	0,785	-0,27	0,856	0,929	0,16	**0,000**	**0,001**	1,13
TFF3	0,891	0,901	0,14	0,101	0,394	0,76	**0,038**	0,308	0,52	**0,003**	**0,014**	0,84
SPDEF	0,678	0,794	0,11	0,776	0,875	0,43	0,355	0,661	0,25	0,563	0,716	1,01
FABP1	0,556	0,691	0,11	0,170	0,450	0,88	0,767	0,892	0,43	0,646	0,757	0,86
CDX2	0,673	0,794	0,10	0,110	0,394	0,24	0,747	0,892	0,09	0,080	0,165	0,29
CA2	0,564	0,691	0,10	0,502	0,732	-0,32	0,054	0,308	-1,10	**0,010**	**0,038**	0,99
TNFSF13	0,384	0,589	0,08	**0,011**	0,124	0,87	0,732	0,892	-0,02	0,051	0,119	0,93
KLF4	0,862	0,893	0,07	0,634	0,795	-0,24	0,956	0,986	0,13	0,879	0,932	0,10
RELA	0,705	0,811	0,06	0,624	0,795	0,07	0,325	0,661	-0,24	**0,003**	**0,014**	0,95

Table S8: Relative expression of mRNA in the jejunum crypts and organoids from 21-day-old suckling and 35-day-old weaned piglets (3/4)

	Crypts			Organoids P0			Organoids P1			Organoids P2		
	P-Value			P-Value			P-Value			P-Value		
Gene	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)
FCGRT	0,963	0,963	-0,01	0,814	0,887	0,02	0,559	0,818	-0,06	**0,014**	**0,045**	0,72
CLDN2	0,796	0,843	-0,05	0,477	0,732	0,12	0,337	0,661	-0,14	**0,000**	**0,003**	1,29
F2RL1	0,404	0,609	-0,07	0,959	0,970	-0,22	0,687	0,886	0,27	0,678	0,784	0,35
TJP1	0,432	0,631	-0,11	0,138	0,409	-0,37	0,053	0,308	-0,47	0,050	0,119	0,93
OCLN	0,567	0,691	-0,11	0,468	0,732	0,16	0,786	0,892	0,10	**0,035**	0,094	0,69
NFKB1	0,545	0,691	-0,13	0,218	0,511	-0,47	0,074	0,366	-0,46	**0,000**	**0,000**	1,04
MKI67	0,820	0,859	-0,16	**0,011**	0,124	-0,61	0,348	0,661	-0,18	**0,017**	0,052	0,78
SOD1	0,773	0,839	-0,16	0,817	0,887	-0,17	0,744	0,892	0,03	**0,000**	**0,001**	0,52
ALPI	0,175	0,324	-0,17	**0,028**	0,238	2,01	0,055	0,308	1,86	**0,006**	**0,025**	1,31
PCNA	0,518	0,688	-0,23	0,113	0,394	-0,57	0,223	0,607	-0,30	**0,000**	**0,000**	1,28
OLFM4	0,553	0,691	-0,24	0,162	0,450	0,48	0,189	0,606	-0,53	0,291	0,471	-0,15
GLUT2	0,887	0,901	-0,31	0,776	0,875	0,40	0,573	0,818	1,31	0,556	0,716	1,18
MUC1	0,369	0,576	-0,35	**0,004**	0,093	1,44	0,446	0,696	-0,23	0,069	0,146	-0,46
NHE3	0,425	0,631	-0,36	0,595	0,795	-0,24	**0,049**	0,308	-0,85	0,598	0,730	0,10
NFKB2	0,711	0,811	-0,47	0,360	0,674	0,26	0,366	0,661	-0,23	0,090	0,182	0,73
CLDN3	**0,002**	**0,010**	-0,53	0,463	0,732	0,29	0,746	0,892	0,08	**0,000**	**0,000**	1,09
HES1	0,067	0,141	-0,61	0,514	0,738	-0,19	0,199	0,607	0,90	0,490	0,673	0,34
LCT	0,062	0,135	-0,85	0,055	0,305	-0,40	**0,001**	**0,031**	-1,58	0,398	0,604	0,58
CFTR	**0,004**	**0,017**	-0,96	0,138	0,409	-0,70	0,050	0,308	-1,05	**0,000**	**0,000**	1,66
CHGA	**0,000**	**0,001**	-1,18	0,625	0,795	0,55	0,947	0,986	0,39	0,491	0,673	0,09
MEP1B	0,767	0,839	-1,39	0,276	0,566	2,15	0,574	0,818	0,40	0,961	0,961	0,76
LBP	**0,000**	**0,000**	-1,42	0,971	0,971	-0,59	**0,001**	**0,041**	-1,19	0,812	0,882	0,30
REG4	**0,000**	**0,001**	-1,45	0,185	0,456	0,39	0,079	0,369	0,58	**0,000**	**0,000**	0,88
SMOC2	**0,000**	**0,000**	-1,50	0,587	0,795	-0,13	0,062	0,327	-0,48	**0,000**	**0,000**	1,18
GCG	**0,003**	**0,013**	-1,52	0,472	0,732	0,08	0,839	0,922	1,23	0,738	0,842	1,89
CCK	**0,000**	**0,000**	-1,55	0,893	0,941	0,74	0,716	0,892	0,52	0,429	0,616	1,19
CELA2A	**0,036**	0,091	-1,60	0,161	0,450	-3,60	0,145	0,538	-2,38	0,948	0,961	0,38

Table S8: Relative expression of mRNA in the jejunum crypts and organoids from 21-day-old suckling and 35-day-old weaned piglets (4/4)

	Crypts			**Organoids P0**			**Organoids P1**			**Organoids P2**		
	P-Value			**P-Value**			**P-Value**			**P-Value**		
Gene	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)	Non-adjusted	Adjusted	Log2(Fold-change)
SOX9	**0,000**	**0,000**	-1,68	0,115	0,394	-0,39	0,127	0,493	-0,50	0,064	0,139	0,77
RETNLB	**0,002**	**0,011**	-1,73	0,436	0,732	-0,02	0,405	0,664	0,24	0,957	0,961	2,53
F10	**0,014**	**0,040**	-1,74	0,371	0,674	-0,56	**0,033**	0,291	-1,08	0,276	0,471	1,44
NEUROG3	**0,001**	**0,004**	-2,00	0,772	0,875	0,31	**0,017**	0,291	-1,78	0,056	0,128	4,55
PYY	**0,000**	**0,000**	-2,35	**0,008**	0,121	-1,35	0,903	0,968	0,61	0,938	0,961	0,83
CA1	**0,034**	0,089	-2,57	0,289	0,566	-2,00	0,326	0,661	0,00	0,891	0,933	0,00
CCL20	0,318	0,505	-2,99	0,107	0,394	0,48	**0,027**	0,291	2,68	0,153	0,296	1,49
F5	**0,001**	**0,003**	-3,06	0,114	0,394	-0,87	0,255	0,612	-0,39	0,182	0,337	0,26
FABP6	**0,039**	0,096	-3,07	**0,030**	0,238	0,95	0,094	0,417	-0,58	0,095	0,189	1,35
LGR5	**0,000**	**0,000**	-3,74	**0,016**	0,156	-2,29	**0,020**	0,291	-2,17	0,060	0,134	0,91

Données complémentaires de l'article 1

Caractérisation des organoïdes de porcelets cultivés en 3D par microscopie confocale et par microscopie électronique à transmission

In vivo, les cellules de l'épithélium intestinal sont polarisées avec leur pôle apical en contact avec l'environnement luminal de l'intestin. Le contrôle de cette polarisation est nécessaire à l'étude des interactions avec les composés luminaux tels que les nutriments, le microbiote et ses métabolites. Cette polarisation épithéliale est également cruciale pour l'organisation des jonctions serrées au pôle apical des cellules. Les études précédentes sur les organoïdes intestinaux de porcs et d'autres espèces ont montré que le pôle apical des cellules est orienté vers l'intérieur des organoïdes (*Beaumont et al., 2021a*). Par ailleurs, nos données d'expression de gènes suggèrent la présence de différents types cellulaires et de jonctions serrées dans les organoïdes de porcelets, comme cela a déjà été montré dans la littérature (*Gonzalez et al., 2013; van der Hee et al., 2018; Beaumont et al., 2021a*). Ici, nous avons complété la caractérisation des organoïdes de porcelets cultivés en 3D en utilisant des approches d'imagerie pour étudier : (i) la polarisation des cellules ; (ii) la présence de jonctions serrées ; et (iii) la diversité des cellules épithéliales.

Matériels et Méthodes

Pour l'analyse en ***microscopie confocale***, les organoïdes ont été cultivés pendant 7 jours comme décrit dans l'article 1 (*Mussard et al., 2022*) dans des plaques 8 puits Labteck (Nunc). Pour marquer les cellules en prolifération, les organoïdes ont été incubés avec de l'EdU 10 µM (Kit EdU Click-iT™ Alexa Fluor™ 594, ThermoFisher) pendant 2 heures à 37°C, 5% CO_2. Les organoïdes ont ensuite été lavés avec du PBS et fixés dans du paraformaldéhyde 4 % pendant 20 min à température ambiante, sous agitation. Par la suite, les organoïdes ont été lavés 2 fois avec du PBS entre chaque étape. Les organoïdes ont été perméabilisés avec du PBS 0,2 % Triton X100 pendant 20 min puis le blocage a été effectué avec du PBS/BSA 10 % pendant 1 heure à température ambiante, sous agitation. La solution de détection de l'EdU fournie dans le kit a été ajoutée pendant 30 min. Pour le marquage de l'occludine, un anticorps primaire dilué au 1/100 (ThermoFisher 71-1500) a été ajouté et incubé à 4°C pendant une nuit, sous agitation. Après lavage, l'anticorps secondaire (Goat anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 488, ThermoFisher A-11008) a été ajouté et incubé pendant 2 heures à température ambiante sous-agitation et à l'abri de la lumière. Les glycoprotéines du mucus ont été marquées avec de l'UEA-1-FITC dilué au 1/200 (« Ulex Europaeus Agglutinin I », L32476, ThermoFisher) pendant 1 heure à température ambiante, sous agitation et à l'abri de la lumière. Enfin, l'actine a été marquée avec de la phalloïdine-TRITC (10 µg/mL, Sigma) pendant 10 min, à température ambiante sous agitation et à l'abri de la lumière. Les puits de la lame Labteck ont été retirés à l'aide d'une pince et le milieu de montage contenant du DAPI (Vectashield H1250) a été ajouté avant de déposer et sceller une lamelle pour l'observation en microcopie confocale. Pour l'analyse en ***microscopie électronique à transmission (MET)***, les organoïdes ont été cultivés 7 jours et récupérés dans le Matrigel® avec une spatule pour être transférés dans un tube. Les organoïdes ont ensuite été fixés dans un tampon glutaraldéhyde à 2,5 % puis ont été préparés et observés à la plateforme CMEAB (Centre de microscopie électronique appliqué à la biologie, GenoToul) de Toulouse.

Résultats et Discussion

Nous avons marqué les cellules en prolifération à l'aide d'un marquage EdU, un analogue de la thymidine qui s'incorpore à l'ADN en cours de réplication. De nombreuses cellules EdU^+ ont été observées dans les organoïdes (***Figure 47A***), ce qui confirme la présence d'un grand nombre de cellules en prolifération, comme suggéré par les résultats d'expression des gènes des marqueurs de prolifération (*PNCA, MKI67*).

L'observation des organoïdes de jéjunum en MET montre que les cellules sont polarisées avec leur pôle basal orienté vers l'extérieur de l'organoïde (vers le Matrigel®), comme indiqué par la position des noyaux, et avec leur pôle apical orienté vers l'intérieur de l'organoïde, comme indiqué par la présence de microvillosités et des jonctions serrées (***Figure 48A et B***). Cette polarisation des cellules des organoïdes a été confirmée par le marquage de l'actine en microscopie confocale, fortement présente au niveau des microvillosités du côté de lumière des organoïdes (***Figure 47B et C***). L'expression de l'occludine détectée en microscopie confocale (vert) confirme la présence des jonctions serrées observée en MET (***Figure 47B et Figure 48B***). Ces résultats sont cohérents avec l'expression des gènes de protéines de jonctions serrées dans les organoïdes de jéjunum de porcelets (*OCLN, CLDN2, CLDN3, TJP1-3*).

La majorité des cellules observées en MET étaient des cellules absorbantes, cependant nous avons également observé une cellule en gobelet dans des organoïdes de jéjunum (***Figure 48C***). La présence de cellules en gobelet a été confirmée en microcopie confocale grâce au marqueur UEA-1 qui est une lectine se fixant aux glycoprotéines du mucus. Le marquage UEA-1 a été observé à l'intérieur de quelques organoïdes, suggérant la sécrétion de mucus par les cellules en gobelet dans certains organoïdes (***Figure 47C***). Cependant, la présence de cellules en gobelet semble rare dans nos organoïdes bien que les gènes marqueurs de ces cellules soient exprimés (*MUC2, SPDEF*).

Nous n'avons pas observé d'autres types de cellules épithéliales sécrétrices dans les organoïdes par MET, habituellement reconnaissables par la position de leurs granules sécrétoires noires (apicales pour les cellules de Paneth et basales pour les cellules entéroendocrines). Pourtant, les gènes marqueurs des cellules entéroendocrines (*NEUROG3, CHGA, CCK, PYY, GCG)* et des cellules de Paneth (*LYZ*) sont exprimés. Cependant ces types cellulaires sont rares et peu de coupes ont été réalisées. La validation d'anticorps spécifiques de ces types cellulaires chez le porc serait nécessaire pour confirmer leur présence. De plus, l'utilisation d'un milieu de culture favorisant la différenciation pourrait permettre d'augmenter le nombre de cellules sécrétrices.

Conclusion

En accord avec la littérature, l'ensemble de nos données montre que les organoïdes de porcelets sont composés de plusieurs types cellulaires, bien que les cellules absorbantes semblent largement majoritaires. Ces cellules sont fortement polarisées et des jonctions serrées ainsi que des microvillosités sont présentes en position apicale, face à la lumière de l'organoïde. Le pôle apical des cellules n'est donc pas directement accessible dans les organoïdes 3D. Nous avons donc par la suite développé un modèle de culture de cellules d'organoïdes de jéjunum en monocouche pour faciliter l'accès aux deux pôles des cellules.

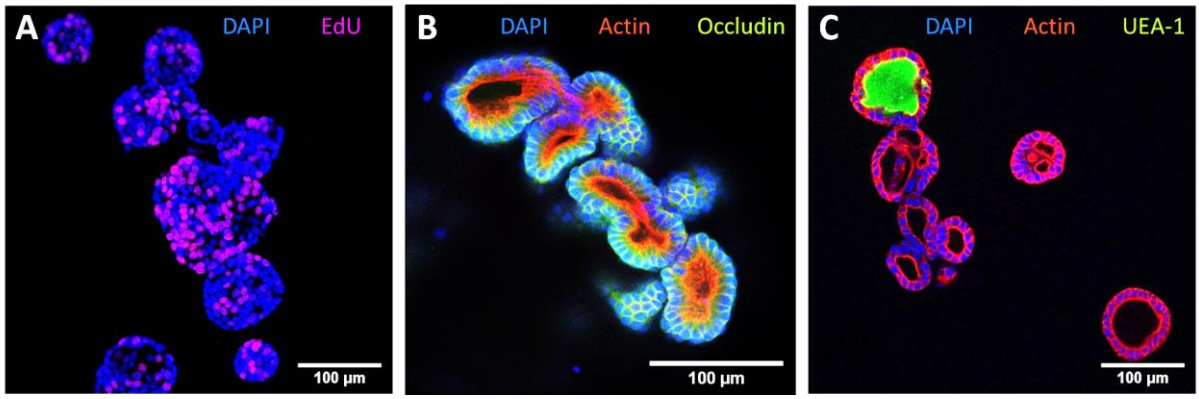


FIGURE 47 : OBSERVATION EN MICROSCOPIE CONFOCALE D'ORGANOÏDES DE JEJUNUM DE PORCELETS ALLAITES CULTIVES EN 3 DIMENSIONS.

Les cellules en prolifération sont marquées par l'incorporation d'EdU (violet, A). Le marquage de l'actine (rouge, B et C) indique la localisation du pôle apical des cellules du côté de la lumière des organoïdes. La protéine de jonction serrée occludine (vert, B) est exprimée par les organoïdes. Certains organoïdes produisent du mucus marqué par UEA-1 (vert, C). L'ADN présent dans les noyaux est marqué en bleu (A, B et C).

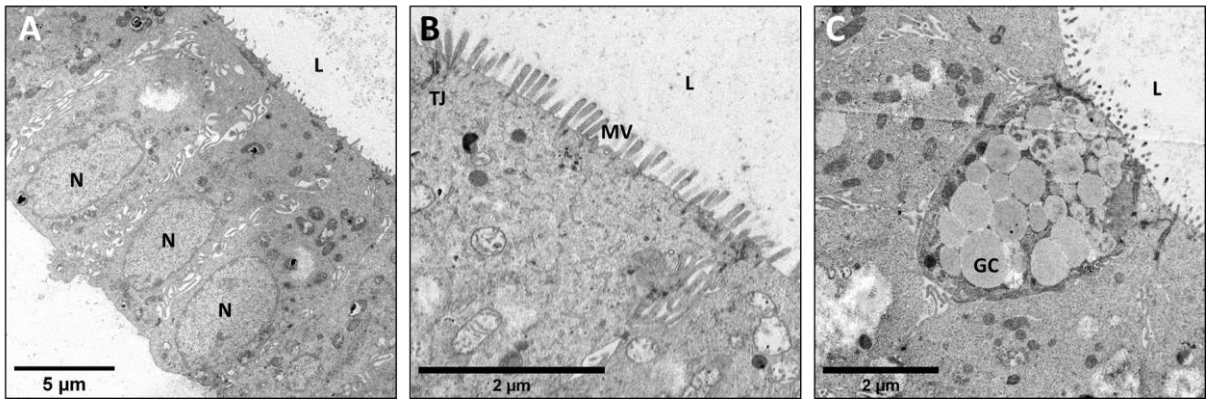


FIGURE 48 : OBSERVATION EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION D'ORGANOÏDES DE JEJUNUM DE PORCELETS ALLAITES CULTIVES EN 3 DIMENSIONS.

(A) Vue d'ensemble de la monocouche de cellules épithéliales polarisées. **(B)** Observation des microvillosités et des jonctions serrées au pôle apical des cellules épithéliales. **(C)** Observation d'une cellule en gobelet contenant des granules de mucus. **L :** Lumen, **N :** Noyau, **MV :** Microvillosités, **TJ :** Tight junctions, **GC :** Goblet cell.

Culture d’organoïdes d’intestin de porcelets à partir de cryptes épithéliales congelées et établissement de monocouches de cellules

Article 2

Culture d'organoïdes intestinaux à partir de cryptes épithéliales cryoconservées et établissement de monocouches de cellules

Eloïse Mussard, Corinne Lencina, Gaëlle Boudry, Caroline S. Achard, Christian Klotz, Sylvie Combes, Martin Beaumont

Journal of Visualized Experiment, 2023

doi : 10.3791/64917

La plupart des études ont décrit la culture des organoïdes d'intestin de porc à partir de cryptes fraichement isolées. Pourtant, il serait préférable de pouvoir dissocier temporellement l'isolement des cryptes et la culture des organoïdes. En effet, le lieu de prélèvement de l'intestin des porcs est souvent éloigné du laboratoire où sont cultivés les organoïdes. De plus, pour des raisons pratiques, il est difficile de cultiver simultanément de nombreuses lignées d'organoïdes. Dans ce contexte, nous décrivons ici une procédure utilisée pour cultiver des organoïdes 3D d'intestin de porc à partir de cryptes épithéliales congelées. Le protocole décrit comment cryoconserver les cryptes épithéliales de l'intestin de porc et les procédures ultérieures pour cultiver des organoïdes intestinaux en 3D. Cette méthode permet de préparer des stocks de cryptes cryoconservées provenant de plusieurs segments intestinaux et de plusieurs animaux, ce qui limite la nécessité de sacrifier des porcs pour obtenir des cellules souches.

La culture des cellules d'organoïdes d'intestin de porc en monocouches permet de faciliter l'accès au pôle apical des cellules qui est le site des interactions avec l'environnement luminal de l'intestin. Cependant, les protocoles décrits dans la littérature pour cette technique sont hétérogènes et relativement peu détaillés. En conséquence, nous avons rencontré des difficultés pour mettre en place cette méthode au laboratoire. Suite à un travail de mise au point, nous présentons ici un protocole détaillé permettant d'établir de manière reproductible des monocouches de cellules dérivées d'organoïdes d'intestin de porcelet.

La description détaillée de ces procédures est accompagnée d'une vidéo permettant d'illustrer chaque étape et ainsi de favoriser la réutilisation de cette technique par d'autres expérimentateurs. Nous présentons également quelques résultats représentatifs obtenus sur les organoïdes cultivés en 3D ou en monocouche pour caractériser leur morphologie, la polarisation des cellules, la formation de jonctions serrées et leur fonctionnalité (TEER). Dans l'ensemble, les protocoles décrits dans cet article constituent une ressource utile pour l'étude de l'épithélium intestinal du porc dans le cadre de la recherche vétérinaire et biomédicale.

Culture of Piglet Intestinal 3D Organoids from Cryopreserved Epithelial Crypts and Establishment of Cell Monolayers

Eloïse Mussard[1,2], **Corinne Lencina**[1], **Gaëlle Boudry**[3], **Caroline S. Achard**[2], **Christian Klotz**[4], **Sylvie Combes**[1], **Martin Beaumont**[1]

[1] GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT [2] Lallemand Animal Nutrition [3] Institut NuMeCan, INRAE, INSERM, Université de Rennes [4] FG 16: Mycotic and Parasitic Agents and Mycobacteria, Robert Koch-Institute

Corresponding Author

Martin Beaumont

martin.beaumont@inrae.fr

Citation

Mussard, E., Lencina, C., Boudry, G., Achard, C.S., Klotz, C., Combes, S., Beaumont, M. Culture of Piglet Intestinal 3D Organoids from Cryopreserved Epithelial Crypts and Establishment of Cell Monolayers. *J. Vis. Exp.* (192), e64917, doi:10.3791/64917 (2023).

Date Published

February 10, 2023

DOI

10.3791/64917

URL

jove.com/video/64917

Abstract

Intestinal organoids are increasingly being used to study the gut epithelium for digestive disease modeling, or to investigate interactions with drugs, nutrients, metabolites, pathogens, and the microbiota. Methods to culture intestinal organoids are now available for multiple species, including pigs, which is a species of major interest both as a farm animal and as a translational model for humans, for example, to study zoonotic diseases. Here, we give an in-depth description of a procedure used to culture pig intestinal 3D organoids from frozen epithelial crypts. The protocol describes how to cryopreserve epithelial crypts from the pig intestine and the subsequent procedures to culture 3D intestinal organoids. The main advantages of this method are (i) the temporal dissociation of the isolation of crypts from the culture of 3D organoids, (ii) the preparation of large stocks of cryopreserved crypts derived from multiple intestinal segments and from several animals at once, and thus (iii) the reduction in the need to sample fresh tissues from living animals. We also detail a protocol to establish cell monolayers derived from 3D organoids to allow access to the apical side of epithelial cells, which is the site of interactions with nutrients, microbes, or drugs. Overall, the protocols described here is a useful resource for studying the pig intestinal epithelium in veterinary and biomedical research.

Introduction

The intestinal epithelium is formed by a monolayer of cells covering the digestive mucosa at the interface with the luminal environment. This position is associated with diverse functions, such as nutrient absorption and barrier function, that are supported by the presence of stem cells and multiple differentiated epithelial cell types (absorptive, enteroendocrine, Paneth, and goblet cells)[1]. Immortalized cell lines traditionally used to study epithelial cells have major

Copyright © 2023 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

limitations, since they do not reflect the cellular complexity of the intestinal epithelium and present genomic abnormalities[2]. The development of three-dimensional (3D) organoids by Sato et al.[3] provided a new model to study the intestinal epithelium with an improved physiological relevance. Indeed, intestinal organoids are derived from non-transformed stem cells, are composed of multiple cell types, and recapitulate the functionality of the intestinal epithelium. Intestinal organoids are increasingly being used to understand the development and functions of the intestinal epithelium and its interactions with pathogens, nutrients, toxins, drugs, the microbiota, and its metabolites[2].

Initially developed for humans and mice, the methods used to culture intestinal organoids have recently been adapted to other species, including pigs[4]. Gonzales et al.[5] were the first to culture pig organoids from the jejunum ; since then, porcine organoids have been described for other gut segments (duodenum, ileum, and colon)[6,7,8], and have been shown to retain a location-specific phenotype[9,10,11]. Pig intestinal 3D organoids are now commonly used to study the effect of nutrients[12,13] or enteric infections[6,8,14].

Most of the studies have described the culture of intestinal organoids starting from freshly isolated epithelial crypts. However, this is not always feasible for logistical reasons, notably when working with large animals such as pigs. Indeed, animal facilities for pigs can be located far from the lab where organoids are cultured, which complicates the work organization. Moreover, organoid culture is time-consuming; thus, it is not practical to simultaneously grow multiple organoid lines, for instance, from different gut segments or several animals. To circumvent these issues, a few studies in humans, horses, and pigs have described methods to culture organoids from frozen intestinal tissues (or biopsies) or from isolated epithelial crypts[4,15,16,17]. These methods allow the cryopreservation of intestinal epithelial stem cells from multiple gut segments of a single animal, which can then be used to grow organoids when needed. Moreover, this allows a strong reduction in the number of live animals used as donors of stem cells, since large stocks of cryopreserved crypts can be created (principles of 3R). Another advantage of this method is the growth of intestinal organoids only from animals of interest after obtaining phenotypic or genotypic results, which is highly cost-effective.

In vivo, intestinal epithelial cells are polarized, with the apical side directed toward the lumen. *In vitro*, in 3D organoids, the apical side of epithelial cells is also facing the lumen (i.e., inside the organoids)[4]. This organization prevents access to the apical side, which is an issue when studying the effects of luminal components (e.g., nutrients, microbes, metabolites) on epithelial cells. To circumvent this disadvantage, several methods have been developed, such as the culture of organoid cells as 2D monolayers, microinjection, and polarity reversal ("apical-out organoids")[18,19]. The culture of organoid cell monolayers is emerging as the most efficient and tractable system. The principle is to dissociate 3D organoids into single cells and seed them on a cell culture vessel previously coated with a thin layer of extracellular matrix (ECM)[20]. In these culture conditions, the apical side of the epithelial cells is facing upward, and is thus accessible to experimental treatments[20]. The culture of organoid cell monolayers was recently adapted for the pig intestine[21,22] ; cell monolayers derived from pig 3D organoids have been used for multiple applications, including the study of enteric infections[6,23,24,25], the transport of nutrients[9], and digestive disease modeling[26].

Copyright © 2023 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

Here, this study first presents a detailed protocol for the culture and maintenance of pig intestinal 3D organoids derived from cryopreserved epithelial crypts (**Figure 1**). Then, a protocol is described to establish cell monolayers from pig intestinal 3D organoids. The methods described here provide experimental tools that can be used to study the pig intestinal epithelium for nutrient transport, barrier function, and host-microorganism interactions.

Protocol

This protocol was approved by the local ethics committee (N°TOXCOM/0136/PP) in accordance with the European directive on the protection of animals used for scientific purposes (2010/63/EU). This protocol is described for the jejunum as an example, but it can be used for each segment of the small and large intestine (duodenum, jejunum, ileum, colon).

1. Isolation of epithelial crypts from the piglet intestine

NOTE: Prepare a stock of complete Dulbecco's modified eagle medium (DMEMc) with DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin (P/S). Prepare 50 mL aliquots and store them at 4 °C for 1 month.

1. Preparation of solutions (to be done on the day of the crypt isolation)
    1. Prepare the dissociation solution containing phosphate buffered saline (PBS), 3 mM dithiothreitol (DTT), 9 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10 µM Y27632 ROCK inhibitor, and 1% penicillin-streptomycin (P/S) and store on ice.
    2. Prepare the freezing solution containing DMEMc, 10% FBS, 10% dimethyl sulfoxide (DMSO), and 10 µM Y27632 ROCK inhibitor and store on ice (the final FBS concentration is 18%).
    3. Prepare the transport solution containing cold PBS supplemented with 1% P/S and store it on ice.
2. Isolation of epithelial crypts
    1. Slaughter a piglet by electronarcosis followed by exsanguination.
    2. Immediately after slaughtering, open the abdomen of the piglet with a scalpel and remove the whole intestine.
    3. Collect approximately 2 cm of an intestinal segment and store it in cold transport solution. Keep the segment on ice until crypt isolation (up to 2 h).
    4. Place the tissue in a Petri dish. Open the intestinal segment longitudinally and carefully wash the tissue in cold PBS supplemented with 1% P/S to remove the intestinal content.
    5. Transfer the tissue to a new Petri dish filled with 10 mL of cold PBS supplemented with 1% P/S.
    6. Hold the tissue with tweezers and remove the villi and the remaining mucus by scraping with a microscope slide.

        NOTE: The removal of the villi (the tongue-shaped structure) can be checked by microscopic observation of the supernatant.
    7. Transfer the tissue to a 15 mL conical tube containing 5 mL of ice-cold dissociation solution and incubate for 30 min at room temperature (RT) on a rotating shaker (15 rpm).
    8. Transfer the tissue to a new Petri dish and add 10 mL of cold PBS supplemented with 1% P/S.

Copyright © 2023 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

9. Isolate the crypts mechanically by firmly scraping the mucosa with a microscope slide.
NOTE: Under a microscope, verify the presence of epithelial crypts in PBS (**Figure 2A**).
10. Aspirate the crypt solution with a serological pipet and filter through a 100 µm cell strainer in a 50 mL conical tube.
11. Pipet 10 µL of the solution and verify the presence of crypts under a microscope. Centrifuge at 300 x *g* for 5 min at 4 °C.
12. Under a sterile biosafety cabinet, discard the supernatant and resuspend the pellet of crypts in 10 mL of cold DMEMc supplemented with 10 µM Y27632 ROCK inhibitor.
13. Pipet 10 µL of the crypt solution into a 48-well plate. Manually count the number of crypts under a microscope with a 10x magnification, and calculate the concentration of crypts per mL of solution.
NOTE: The isolated crypts can be used directly to culture intestinal organoids. However, it is often more convenient to cryopreserve a large batch of crypts from each piglet and use them later for organoid culture.

3. Freezing of epithelial crypts
    1. Transfer a volume corresponding to 900 crypts in a 15 mL conical tube. Centrifuge at 300 x *g* for 5 min at 4 °C.
    2. Discard the supernatant and resuspend the pellet of crypts in 1 mL of the freezing solution. Transfer to a cryotube and place the vial in a cell-freezing container.
    3. Store the cell freezing container at -80 °C for 24 h and then transfer the vials to liquid nitrogen for long-term storage.

2. Establishment of piglet intestinal 3D organoids from frozen epithelial crypts

NOTE: Piglet intestinal 3D organoids are cultured in a commercial culture medium formulated for the growth of human organoids, supplemented with 1% P/S and 100 µg/mL of an antimicrobial agent for primary cells, and stored at 4 °C for up to 1 week. A tumor-derived extracellular matrix (ECM) is used for the culture of 3D organoids. All references of commercial products are presented in the **Table of Materials**.

1. Preparation of materials
    1. Place the pipet tips at -20 °C (at least overnight).
    2. Place the frozen aliquots of the ECM (500 µL) at 4 °C at least 1 h in advance.
    3. Pre-warm a 48-well plate in a 37 °C, 5% CO_2 incubator.
    4. Place the culture medium at RT.
    5. Pre-warm a water bath at 37 °C.
    6. Place a small ice bucket under the hood under aseptic conditions.
2. Thawing of frozen epithelial crypts
    1. Quickly thaw a vial containing 900 frozen crypts in water bath at 37 °C (less than 5 min).
    2. Transfer the crypt solution into a 15 mL conical tube.
    3. Centrifuge at 300 x *g* for 5 min at RT. Remove the supernatant
    4. Add 150 µL of the ECM with cooled tips to obtain a final concentration of 150 crypts per 25 µL of ECM.

Copyright © 2023 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

Pipet up and down 10 times to obtain a homogenous suspension of crypts in the ECM.

NOTE: Always keep the ECM on ice to avoid polymerization. Always use pre-chilled pipet tips at -20 °C to manipulate the ECM. Pipet slowly to avoid making air bubbles in the ECM. An undiluted ECM is used at this step to prevent the small drops from collapsing.

5. Seed six wells with a 25 µL drop per well with cooled tips in a pre-warmed 48-well plate.

NOTE: Keep the tip vertical, in the center of the well, and pipet slowly without introducing air to obtain a dome. Here, 48-well plates are used, since the organoid number is usually low when starting from frozen crypts.

6. Incubate for 30 min in a 37 °C, 5% CO_2 incubator for polymerization of the ECM.

7. Add 250 µL per well of culture medium at RT. Incubate in a 37 °C, 5% CO_2 incubator and change the culture medium every 2-3 days

NOTE: The crypts are usually not visible after the thawing procedure, and most of the cells are dissociated in the ECM (**Figure 2B**).

3. Passage of piglet intestinal 3D organoids derived from frozen crypts

NOTE: The time to obtain organoids from frozen crypts is usually longer than when starting from fresh crypts. Organoids are usually ready for splitting 10 days after thawing (**Figure 2B**).

1. Preparation of materials

1. Place the frozen aliquots of the ECM (500 µL) at 4 °C for at least 1 h.

2. Pre-warm the 24-well plates at 37 °C.

3. Pre-warm the PBS and the enzyme dissociation reagent supplemented with 10 µM Y27632 ROCK inhibitor in a water bath at 37 °C.

4. Place the culture medium at RT.

5. Place a small ice bucket under the hood under aseptic conditions.

2. Passage of 3D organoids derived from frozen crypts

1. Remove the culture media and wash with 250 µL of pre-warmed PBS at 37 °C.

2. Add 250 µL of pre-warmed enzyme dissociation reagent supplemented with 10 µM Y27632 ROCK inhibitor at 37 °C in each well.

NOTE: Due to the low number of organoids, the dissociation of organoids is performed directly in each well.

3. Detach the organoids in the ECM by scraping with a P1000 pipet, and homogenize carefully by pipetting five times.

4. Incubate for 5 min in a 37 °C, 5% CO_2 incubator. Dissociate the cells by pipetting up and down 10 times using a P1000 pipet.

NOTE: The objective is to obtain isolated cells or small cell clusters (<10 cells). Verify the dissociation under a microscope. If large fragments of organoids are still observed, repeat step 3.2.4.

5. Add 500 µL of DMEMc in each well containing dissociated cells, and pool up to 12 wells in a 15 mL conical tube containing 3 mL of cold DMEMc.

6. Centrifuge at 500 x *g* for 5 min at 4 °C. Discard the supernatant and resuspend the pellet in 1 mL of cold DMEMc.

Copyright © 2023 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

7. Count the cells with a dilution of 1:2 in Trypan blue with a cell counter.
   NOTE: The automated cell counter can count the cells within small clusters, if present.
8. Centrifuge the necessary volume of the cell solution to have 3,000 live cells per dome (one dome per well of the 24-well plate) at 500 x *g* for 5 min at 4 °C.
9. Resuspend the cells with 17 µL of cold DMEMc per 3,000 live cells on ice. Adjust the volume to the required number of wells.
10. Slowly add 33 µL of cold ECM with cooled tips per 3,000 live cells and homogenize on ice without making bubbles. Adjust the volume to the required number of wells.
    NOTE: The cells are resuspended in a solution containing 1/3 DMEMc and 2/3 ECM. For each dome, 50 µL of this solution is needed. Diluted ECM is cheaper and easier to pipet.
11. Seed the wells with 50 µL of the ECM-cell suspension per well with cooled tips in a pre-warmed 24 well-plate.
12. Incubate for 30 min in a 37 °C, 5% CO_2 incubator for polymerization of the ECM.
13. Add 500 µL of the culture medium per well. Incubate in a 37 °C, 5% CO_2 incubator and change the culture medium every 2-3 days
    NOTE: The organoids can either be used directly for i) experiments, ii) maintenance of the 3D organoid culture, iii) freezing, or iv) seeding of the organoid cell monolayers (**Figure 1**). Check the growth of the organoids with a microscope every day to choose the optimal timing for splitting the organoids. The organoids must have a clear and empty lumen and well-defined edges. Mature organoids with black debris in the lumen should not be used for splitting (**Figure 3**).

4. Maintenance of organoid culture in 3D

NOTE: For passaging, organoids should appear clear with an empty lumen. Black debris appears in the lumen approximately 5 days after splitting and indicates the presence of dead cells. Limiting the number of dead cells at the time of passaging is preferable for optimal maintenance of the culture. The schedule should thus be adapted to avoid reaching this stage of maturity.

1. Preparation of material
   1. Place the aliquots of the ECM (500 µL) at 4 °C for thawing for at least 1 h.
   2. Pre-warm a 24-well plate at 37 °C.
   3. Pre-warm the enzyme dissociation reagent supplemented with 10 µM Y27632 ROCK inhibitor in a water bath at 37 °C.
   4. Place the culture medium at RT.
   5. Place a small ice bucket under the hood under aseptic conditions.
2. Passage of intestinal 3D organoids
   1. Detach the organoids with the ECM by scraping with a P1000 pipet. Homogenize carefully by pipetting in the culture medium, and transfer to a 15 mL conical tube containing 5 mL of cold DMEMc on ice. NOTE: One 15 mL conical tube is required for a pool with 12 wells of organoids cultured in 50 µL domes in 24-well plates.
   2. Centrifuge the collected organoids at 500 x *g* for 5 min at 4 °C.

Copyright © 2023 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

NOTE: The organoids form a white pellet at the bottom of the tube. If the organoids are still in the suspension in the ECM after centrifugation, carefully aspirate the upper supernatant (without touching the ECM layer), homogenize by pipetting 10 times with a P1000 pipet, and repeat the centrifugation step. The ECM layer should not be visible after this procedure.

3. Carefully aspirate the supernatant and resuspend the cell pellet in 1 mL of pre-warmed enzyme dissociation reagent supplemented with 10 µM Y27632 ROCK inhibitor. Pipet up and down 10 times to initiate dissociation of the organoids.
4. Incubate for 5 min in a 37 °C water bath for enzymatic digestion.
5. Mechanically disrupt the organoids by pipetting 10 times with a P1000 pipet. Check the cell suspension under the microscope.

NOTE: The objective is to obtain isolated cells or small cell clusters. If large organoid fragments are still observed, repeat the incubation (step 4.2.4) and the mechanical disruption (step 4.2.5).

6. Add 4 mL of ice-cold DMEMc. Centrifuge at 500 x *g* for 5 min at 4 °C
7. Discard the supernatant and resuspend the organoid cell pellet in 1 mL of DMEMc.
8. Proceed as described above (steps 3.2.7 to 3.2.13) to count the cells and seed the organoid cells in 50 µL of ECM domes containing 3000 live cells in pre-warmed 24-well plates.

5. Freezing of 3D organoids

1. Prepare the necessary volume (1 mL for a pool of two domes) of freezing solution containing DMEMc supplemented with 10% FBS, 10% DMSO, and 10 µM Y27632 ROCK inhibitor and store on ice (the final FBS concentration is 18%).
2. Remove the culture medium from the wells to be frozen.
3. Add 1 mL of the freezing solution to the first well to be frozen, detach the ECM by scraping, and homogenize with the pipet tip.
4. Transfer the organoid suspension from the first well to the second well to be frozen.
5. Transfer the pool of the two wells to a cryotube and place the vial in a cell-freezing container.
6. Store the cell freezing container at -80 °C for 24 h, and then transfer the vials to liquid nitrogen for long-term storage.

6. Culture of cell monolayers derived from 3D organoids

NOTE: Monolayers of pig organoid cells are cultured in a 2D medium composed of the culture medium used for 3D organoids supplemented with 20% FBS.

1. Preparation of materials
    1. Prepare the 2D medium and keep it at RT.
    2. Pre-warm the enzyme dissociation reagent supplemented with 10 µM Y27632 ROCK inhibitor in a water bath at 37 °C.
2. Coating of the culture insert
    1. Sterilize a pair of tweezers and transfer them to the biosafety cabinet.
    2. Place the cell culture inserts (0.33 cm^2) into a 24-well plate with the tweezers.

Copyright © 2023 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

3. Prepare the coating solution containing collagen IV diluted at 50 µg/mL in cold PBS. Pipet up and down to mix
4. Add 150 µL of the diluted collagen IV solution to each cell culture insert, which corresponds to 22.7 µg/cm^2.

   NOTE: Carefully orient the pipet vertically into the center of the permeable membrane and check that the collagen solution covers all the membrane.
5. Place the plate in a 37 °C, 5% CO_2 incubator and leave overnight (or for a minimum of 3 h).

3. Seeding of 3D organoid cells into cell culture inserts
   1. Prepare a cell suspension from the 3D organoids, as described in steps 4.2.1 to 4.2.7.
   2. Count the cells with a dilution of 1:2 in Trypan blue with a cell counter, and calculate the necessary volume to seed 2.5 x 10^5 cells per culture insert, corresponding to 7.6 x 10^5 cells/cm^2.
   3. Centrifuge the necessary volume of the cell suspension at 500 x *g* for 5 min at 4 °C.
   4. During centrifugation, carefully aspirate the coating solution from the culture inserts, and allow to dry at RT under the hood without the lid for 5 min.
   5. After centrifugation, discard the supernatant and resuspend the cell pellet in the necessary volume of 2D medium supplemented with 10 µM Y27632 ROCK inhibitor. A volume of 200 µL of 2D medium containing the cells is needed for each insert.
   6. Seed 200 µL of the cell suspension (2.5 x 10^5 cells) onto the coated permeable membrane (apical side) (**Figure 4A**).

      NOTE: Pipet slowly in the center of the membrane and keep the tip vertical.
   7. Add 500 µL of the 2D medium supplemented with 10 µM Y27632 ROCK inhibitor to the lower compartment (basal side). Incubate in a 37 °C, 5% CO_2 incubator.
   8. One day after seeding, replace the apical and basal media with fresh 2D medium without the Y27632 ROCK inhibitor.
   9. Change the 2D medium each day. The monolayer becomes confluent 1 day after seeding, and can then be used for experiments.

      NOTE: A transepithelial electrical resistance (TEER) value above the blank (insert without cells) confirms that confluency is reached (**Figure 4B**).

7. Immunostaining of organoid cell monolayers

1. Preparation of solutions

   NOTE: Adjust the volume of solutions according to the number of wells to be stained; 200 µL of the solution is required at each step for one well. References to all commercial products are provided in the **Table of materials**.
   1. Prepare a 4% paraformaldehyde (PFA) solution under a chemical hood by adding 5 mL of 32% PFA to 35 mL of PBS. Prepare 10 mL aliquots and store at -20 °C.

      CAUTION: Always manipulate the PFA under the chemical hood, while wearing nitrile gloves.
   2. Prepare a solution of 0.2% Triton X100-PBS, by adding 2 µL of Triton X100 to 1 mL of PBS immediately before use. Keep at RT.

Copyright © 2023 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

3. Prepare a 10% bovine serum albumin (BSA)-PBS solution by adding 100 mg of BSA to 1 mL of PBS. Keep at RT.
4. Prepare a 1% BSA-PBS solution by adding 10 mg of BSA to 1 mL of PBS. Keep at RT.
5. Prepare a solution of the occludin primary antibody diluted at 1:200 by adding 5 µL of primary antibody to 995 µL of 1% PBS BSA. Keep the solution on ice.
6. Prepare a solution of the secondary antibody diluted at 1:1,000 by adding 1 µL of secondary antibody to 999 µL of 1% BSA-PBS. Keep the solution on ice, protected from light.
7. Prepare a solution of phalloidin TRITC at 10 µg/mL by adding 10 µL of TRITC at 1 mg/mL to 990 µL of PBS. Keep on ice, protected from light.

2. Immunostaining

NOTE: Unless indicated otherwise, all the incubations are performed at RT, under slow agitation on a rocking platform (30 rpm). The immunostaining is performed directly in the cell culture insert.

1. Remove the basal and apical medium. Place the plate under the chemical hood.
2. Wash the monolayers twice with 200 µL of PBS at RT and incubate for 5 min.
3. Fix the cell monolayers with 200 µL of 4% PFA at RT and incubate for 20 min at RT.
4. Wash the monolayers twice with 200 µL of PBS at RT and incubate for 5 min.

   NOTE: After the fixation and wash steps, the monolayer can be kept at 4 °C in PBS for 1 week.
5. Remove the PBS, permeabilize with 200 µL of 0.2% Triton X100-PBS, and incubate for 20 min.
6. Wash the monolayers twice with 200 µL of PBS at RT and incubate for 5 min.
7. Add 200 µL of primary antibody solution in 1% BSA-PBS and incubate overnight at 4 °C, under slow agitation on a rocking platform. Include a negative control well by adding only 1% BSA-PBS without the primary antibody.
8. Wash the monolayers three times with 200 µL of PBS at RT and incubate for 5 min.
9. Add 200 µL of secondary antibody in 1% BSA-PBS and incubate at RT for 2 h, protected from the light.
10. Wash the monolayers three times with 200 µL of PBS at RT and incubate for 5 min.
11. Add 200 µL of phalloidin TRITC at 10 µg/mL and incubate for 10 min.
12. Wash the monolayers twice with 200 µL of PBS at RT and incubate for 5 min.
13. Remove the PBS and cut the membrane with a scalpel.
14. Recover the membrane with a pair of tweezers and place it on a microscope slide, with the apical side facing upward.
15. Add 15 µL of the mounting medium supplemented with DAPI at 1:1,000 directly on the membrane. Place a coverslip and seal.
16. Store at 4 °C, protected from light, until imaging.

Copyright © 2023 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

Representative Results

Following the protocol described above, epithelial crypts are obtained from the pig intestine and cryopreserved for long-term storage in liquid nitrogen (**Figure 1** and **Figure 2A**). After thawing, the crypt stem cells are seeded in the ECM (**Figure 2B**). The crypt structure is usually lost after this step, due to the disintegration of the crypt structure in the ECM. The organoids can be observed within 3-4 days, and then rapidly grow and develop budding structures (**Figure 2B**). We successfully obtained organoids after thawing frozen crypts in >80% of attempts. Approximately 10 days after thawing (according to the growth rate of organoids), a passage of organoids is performed to expand the culture (**Figure 3**). The organoids grow faster after splitting, and they present diverse morphologies, with some cystic and a majority of budding organoids. For optimal maintenance of the culture, the organoids used for passaging must present a clear and empty lumen and well-defined edges (examples indicated by green arrows) with no black debris in the lumen (indicated by red arrows), as observed in mature organoids (**Figure 3**). We found that black cell debris starts accumulating around day 6 post-passaging. Thus, splitting or freezing the organoids at day 4-5 post-passaging is recommended.

The maturity stage of the organoids is also an important point in obtaining cell monolayers. Organoids with advanced maturity (indicated by the presence of black cell debris in the lumen) are not optimal to seed monolayers. We usually dissociate 3D organoids 4 days after passage to collect cells for 2D culture. Approximately one to three wells of 3D organoids cultured at 3,000 cells per 50 µL dome of the ECM are needed for seeding one culture insert with 2.5 x 10^5 cells. Cells attach and form a fully confluent monolayer within 1 day (**Figure 4A**), which is confirmed by the high TEER of around 700 Ω·cm^2 (**Figure 4B**). However, the cell edges are difficult to visualize by brightfield microscopy at this early time point, probably due to a low differentiation level. The TEER remains high for 3 days (**Figure 4B**).

Actin staining indicates that the apical side of the epithelial cells is oriented toward the lumen in 3D organoids (**Figure 5A**). Organoid cells seeded in culture insert form a confluent single layer of epithelial cells, with the apical side oriented toward the upper compartment (**Figure 4B,C**). Occludin staining reveals the presence of tight junctions at the apical side of the epithelial cells in 3D organoids and in cell monolayers (**Figure 5A-C**).

Copyright © 2023 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

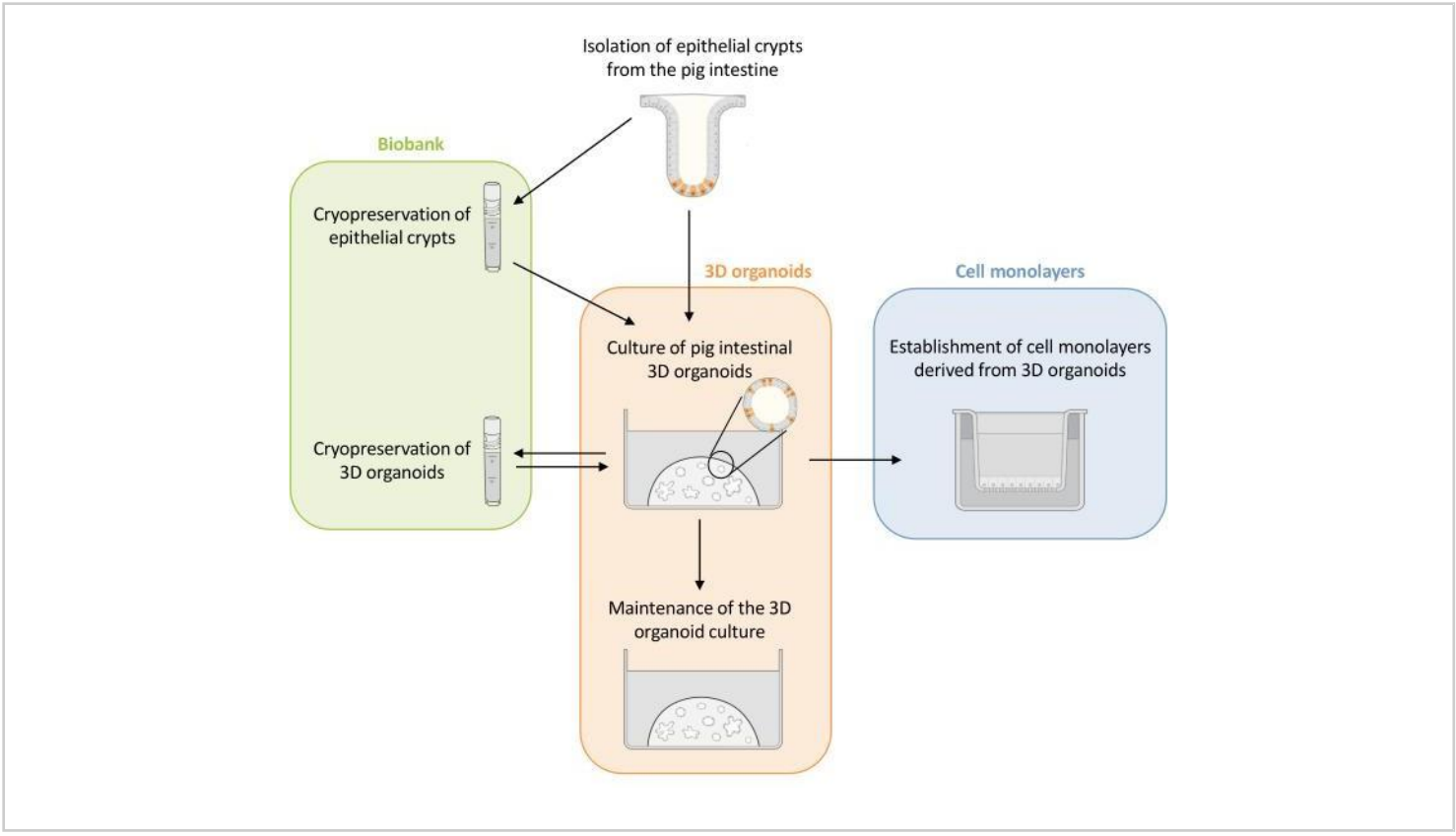


Figure 1: Schematic representation of the methods used to culture 3D organoids and cell monolayers derived from organoids. Epithelial crypts are isolated from the piglet intestine. These crypts can i) be used immediately to culture 3D organoids or ii) be frozen and stored in a biobank in liquid nitrogen. Cryopreserved crypts can be thawed and used to culture 3D organoids. The 3D organoid culture can be maintained with successive splitting, or frozen and stored in the biobank. Cell monolayers can be obtained from the 3D organoid culture to allow access to the apical side of the cells and study the epithelial barrier function. Please click here to view a larger version of this figure.

Copyright © 2023 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

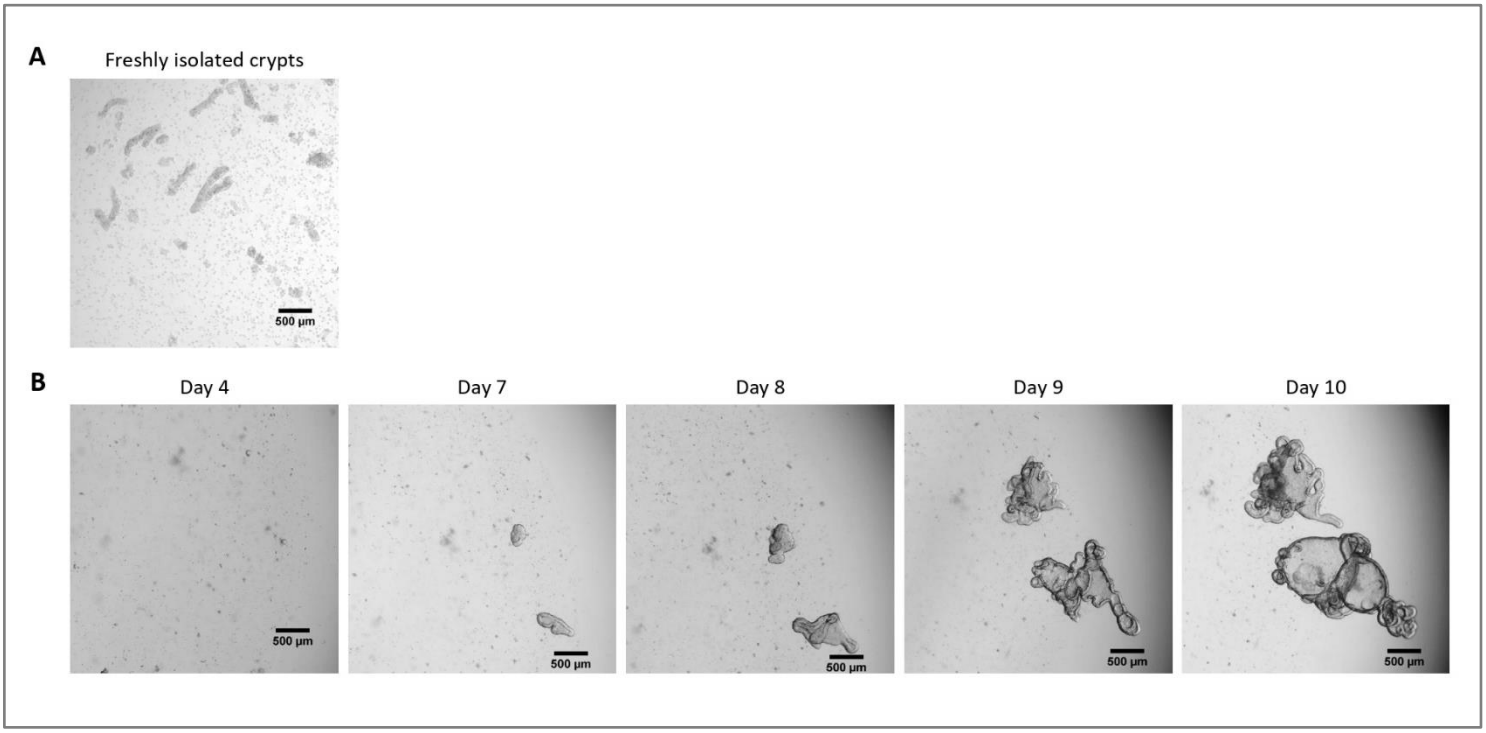


Figure 2: Culture of pig intestinal 3D organoids from cryopreserved epithelial crypts. (**A**) Representative microscopic image of freshly isolated jejunal crypts. (**B**) Representative microscopic images of 3D organoids obtained after thawing of the jejunal crypts. The organoids were cultured in a 25 µL dome of ECM in a 48-well plate. The figure shows images of the 3D organoids at 4, 7, 8, 9, and 10 days post-seeding. The scale bar represents 500 µm. Please click here to view a larger version of this figure.

Copyright © 2023 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

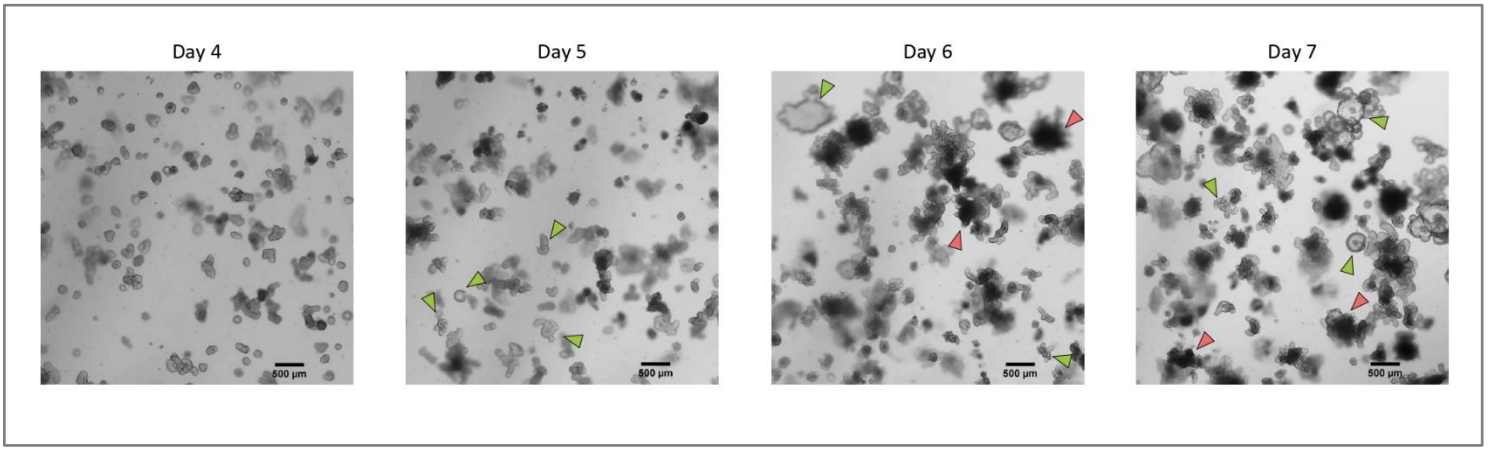


Figure 3: Morphology of pig intestinal 3D organoids derived from cryopreserved epithelial crypts after the first passage. Representative microscopic images showing the development of organoids derived from cryopreserved jejunum crypts after the first passage from day 4 to day 7. Green arrows indicate clear organoids appropriate for the passage or seeding of monolayers. Red arrows indicate mature organoids not suitable for splitting or seeding monolayers; thus, wells should be used before the apparition of this morphology. The scale bar represents 500 µm. Please click here to view a larger version of this figure.

Copyright © 2023 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

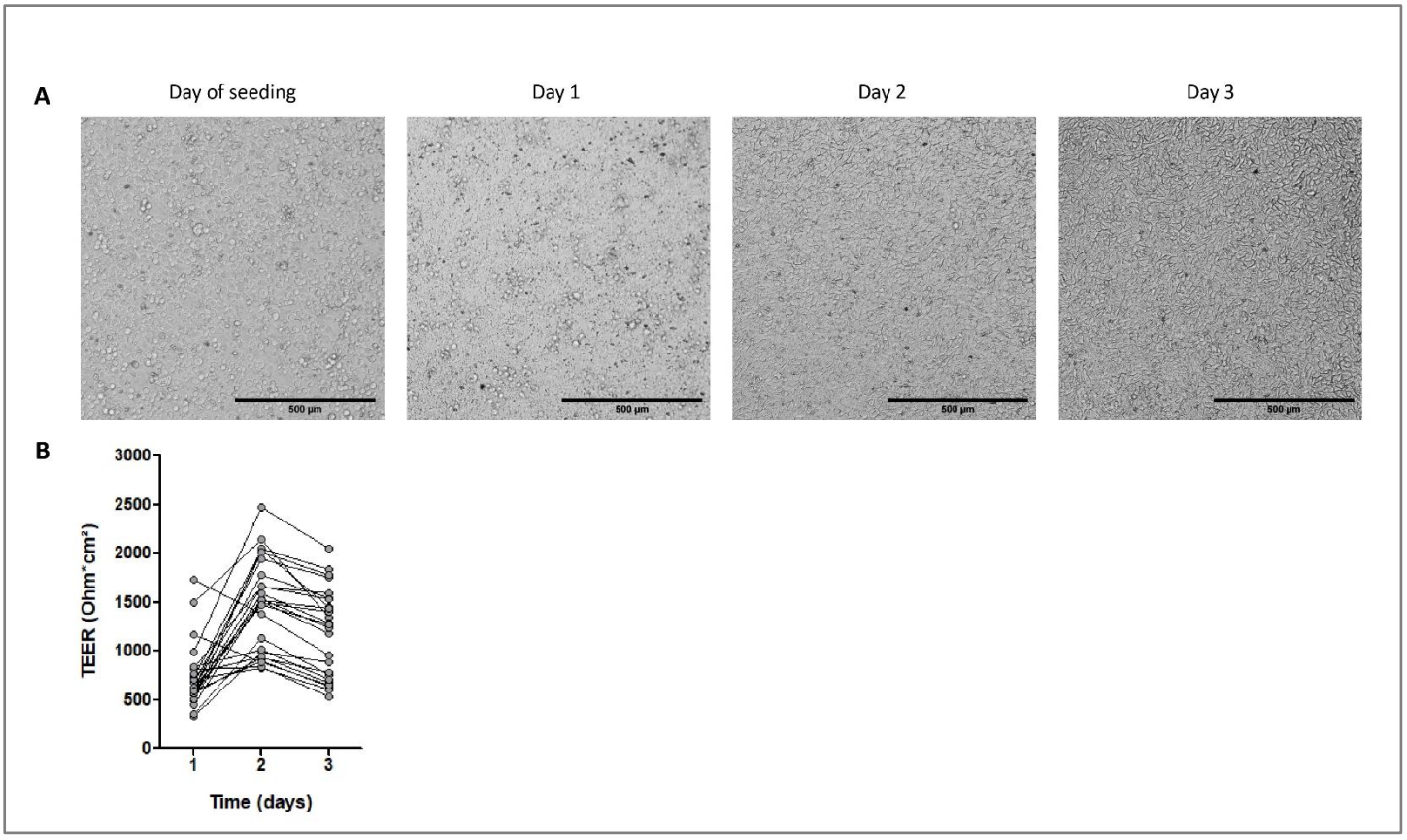


Figure 4: Characteristics of cell monolayers derived from pig intestinal 3D organoids. (**A**) Representative microscopic images of the monolayer morphology over 3 days. Jejunum organoid cells were seeded at 2.5 x 10^5 cells into 0.33 cm^2 cell culture inserts coated with collagen IV at 50 ng/mL. The scale bar represents 500 µm. (**B**) Transepithelial electrical resistance (TEER) of organoid cell monolayers over 3 days. Dots connected by a line correspond to the same well at different times. Please click here to view a larger version of this figure.

Copyright © 2023 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

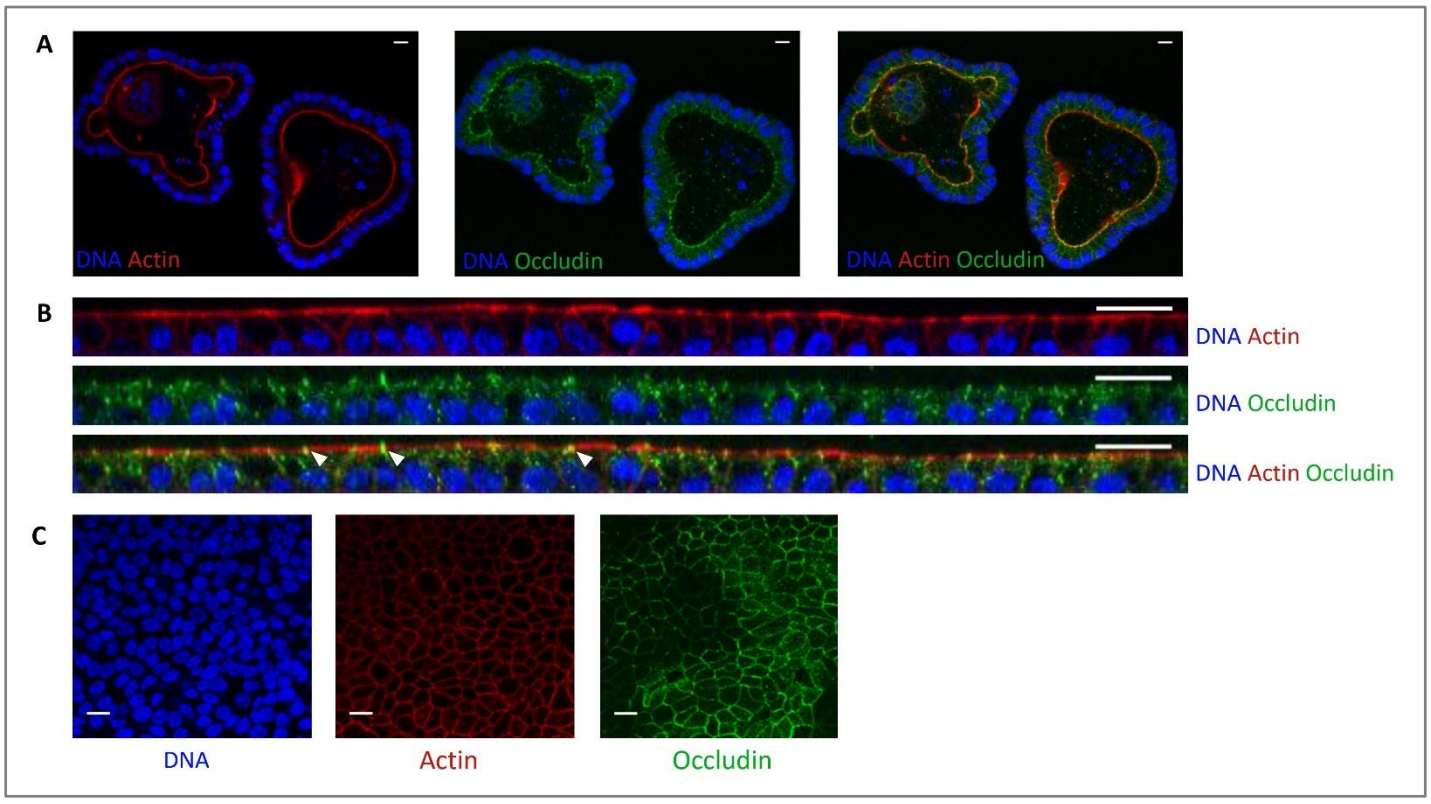


Figure 5: Imaging of pig jejunum organoids cultured in 3D or 2D. Confocal microscopy imaging of (**A**) 3D organoids 5 days after splitting and (**B**,**C**) organoid cell monolayers 3 days after seeding (**B**: XZ section; **C**: XY section). DNA (blue) was stained with DAPI. Actin (red) was stained with phalloidin. Occludin (green) was stained with a polyclonal antibody. White arrows indicate occludin localized at the tight junction. The scale bar represents 20 µm. Please click here to view a larger version of this figure.

Discussion

This protocol describes a method used to cryopreserve epithelial crypts from the piglet intestine for the long-term storage and subsequent culture of 3D organoids. This protocol uses a freezing solution containing DMSO, FBS, the Y27632 ROCK inhibitor, DMEM, and antibiotics. Another study in pigs obtained organoids from crypts cryopreserved in a similar freezing solution but without the ROCK inhibitor[15]. The Y27632 ROCK inhibitor was included to prevent apoptosis and maintain the stem cell pool since, after thawing, epithelial crypt cells are dissociated, which may lead to cell death ('anoikis')[27,28]. Interestingly, equine enteroids have been obtained from epithelial crypts frozen in a culture medium containing only DMEM and DMSO[16]; this simple method has not been tested for pig epithelial crypts yet. Other methods have been published to grow human and pig organoids from frozen tissues or biopsies instead of epithelial crypts[4,17]. The advantage of this method is the ability to directly cryopreserve the intestinal tissues without performing the crypt isolation procedure, which requires time and laboratory equipment. This might be convenient when the tissues have to be collected far from the lab. However,

Copyright © 2023 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

when isolating the crypts immediately after slaughter, large segments of the intestine can be processed to obtain a very high number of crypts, which is not the case when starting from small frozen tissue fragments. After the thawing of epithelial crypts, organoids were observed from 3-4 days post-seeding and split after 10 days. This is a slower growth rate than when starting the culture from fresh epithelial crypts, for which the organoids were obtained from day 1 post-seeding, and can usually be split at around day 5[11]. Khalil et al. also reported a delayed growth of pig enteroids when starting from frozen crypts[15], suggesting that stem cells might require time to recover their proliferative capacity. We also obtained a lower number of organoids when starting from frozen crypts compared to fresh crypts, which might be due to the death of stem cells during the freezing process. In some attempts of crypts thawing (<20%), we did not obtain organoids from frozen crypts, probably due to a suboptimal cryopreservation procedure (e.g., delayed freezing after crypt isolation of probably more than 1 h). Thus, we recommend keeping the crypts on ice until counting, and freezing them as quickly as possible.

For 3D organoids, we chose to use a commercial organoid culture medium formulated for humans. Indeed, previous reports have showed that pig intestinal organoids grow efficiently with this medium[8, 11, 14, 19, 25, 26, 29, 30]. It is of interest for this culture medium to be ready-to-use and have a standardized concentration of growth factors within a batch. However, this culture medium is costly, its composition is undisclosed, and it is thus not possible to modulate its composition. In contrast, other studies have cultured pig intestinal organoids in customized media containing pharmacological inhibitors, recombinant growth factor, and/ or conditioned media[5, 6, 7, 21]. Although highly flexible and cheaper, this method is time-consuming for the production of conditioned media and might lack reproducibility due to potential variability in the concentration of growth factors in conditioned media. Thus, the quality of each batch of conditioned media should be validated by measuring organoid growth or marker gene expression[31].

A study has showed that pig jejunal organoids cultured in the same commercial organoid culture medium used here grew faster and seemed less differentiated, compared to enteroids cultured with media containing recombinant growth factor and/or conditioned media[23]. A high proliferative state facilitates the culture of 3D organoids, but might require inducing differentiation to be more representative of intestinal physiological characteristics. In this protocol, for the passage of 3D organoids, the cells are fully dissociated for counting, allowing to control the number of cells seeded in ECM. This increases the reproducibility of the phenotype of organoids, which is highly influenced by their density. Moreover, counting the cells avoids obtaining too low or an overcrowded culture, that requires adapting the culture schedule. Most other studies prepared organoid fragments not fully dissociated to single cells, and used a dilution ratio for passaging. This method is more straightforward, but might induce variability according to the organoid density of the culture.

For the culture in monolayers, organoid cells are seeded in culture inserts precoated with a thin layer of ECM, that allows the attachment of cells but avoids the growth of organoids in 3D. This protocol used collagen type IV as an ECM protein, as described previously in pigs[23]. Other studies with pig organoid monolayers used the same tumor-derived ECM used here to culture 3D organoids[6, 8, 9, 21, 25, 30]. The advantage of using collagen is the ability to standardize the protein concentration with a fully defined composition, which is not the case in the tumor-derived ECM. A critical step for the

Copyright © 2023 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

success of the culture of cell monolayers is to pay attention to the visual appearance of the precursor 3D organoids, which should have well-defined edges and an empty lumen without black debris. Indeed, organoids with a high maturation level and a low proliferative rate are not an appropriate source of cells for 2D culture. Thus, the timing of the dissociation of 3D organoids into single cells is crucial for the success of this step.

The culture of 2D monolayers from single cells allows standardizing the number of cells seeded, which is more difficult when starting from organoid fragments, as performed in some other methods. We seeded 7.6 x 10^5 cells per cm^2, which is high compared to most other studies[21, 22, 23] in pigs that used a lower cell density, ranging from 0.25 x 10^5 cells per cm^2 to 1.78 x 10^5 cells per cm^2. The requirement of a high number of organoid cells constitutes a limitation of this protocol, but it allowed us to quickly obtain a confluent monolayer, fully covering the culture insert after 1 day. In contrast, Vermeire et al.[23] obtained confluency after 4-7 days with a lower density of cells seeded (from 0.25 x 10^5 cells/ cm^2 to 0.4 x 10^5 cells/cm^2). Some studies have also used pig organoid cell monolayers that did not fully cover the culture surface for infections with viruses[8, 30]. In these conditions, the apical side of epithelial cells is accessible for treatments, but fully confluent monolayers are required if the objective is to study nutrient absorption or epithelial permeability.

For organoid cell monolayers, a commercial organoid culture medium supplemented with 20% FBS was used, based on a recent study on bovine enteroid-derived monolayers[32]. In our tests, the supplementation with 20% FBS was necessary to obtain fully confluent monolayers, probably due to a high growth factor requirement. On the contrary, other studies using the same commercial medium have established monolayers without additional FBS[8, 25, 30], but without reaching full confluency. Other studies have also used supplementation with 20% FBS in a customized medium for the culture of pig organoid cell monolayers[21, 22]. In our experiments, TEER is high 1 day after seeding (around 700 Ω·cm^2), and remains high until day 3 (around 1,500 Ω·cm^2; this is consistent with the formation of tight junctions, as indicated by the expression of occludin. Van der Hee et al. obtained similar TEER values over 72 h for jejunum organoid cell monolayers[21]. They also demonstrated that monolayers can be maintained until day 12-15 with daily media changes. In contrast, other studies have reported much lower TEER values (around 200 Ω·cm^2) for pig organoid cell monolayers[6, 22]. These differences between studies might be related to the gut segment studied or to the media used that influence epithelial differentiation.

In conclusion, the above protocol to grow pig intestinal 3D organoids from frozen epithelial crypts facilitates the organization of the culture work. It reduces the need for fresh tissues to be obtained from living animals. We also explain how to establish fully confluent cell monolayers derived from pig organoids in less than 3 days. Thus, our protocols could be useful resources for scientists studying the pig intestinal epithelium for veterinary or biomedical research.

Disclosures

The authors have nothing to disclose.

Acknowledgments

This work was supported by Institut Carnot France Futur Elevage ("OrganoPig" project) and by INRAE HOLOFLUX ("Holopig" project). The authors are grateful to the Genotoul core facilities (TRI). We acknowledge Christelle Knudsen (GenPhySE, INRAE, Toulouse) for careful proofreading.

Copyright © 2023 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

References

1. Peterson, L. W., Artis, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology.* **14** (3), 141-153 (2014).
2. In, J. G. et al. Human mini-guts: new insights into intestinal physiology and host-pathogen interactions. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology.* **13** (11), 633-642 (2016).
3. Sato, T. et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* **459** (7244), 262-265 (2009).
4. Beaumont, M. et al. Intestinal organoids in farm animals. *Veterinary Research.* **52** (1), 33 (2021).
5. Gonzalez, L. M., Williamson, I., Piedrahita, J. A., Blikslager, A. T., Magness, S. T. Cell lineage identification and stem cell culture in a porcine model for the study of intestinal epithelial regeneration. *PLoS One.* **8** (6), e66465 (2013).
6. Holthaus, D., Delgado-Betancourt, E., Aebischer, T., Seeber, F., Klotz, C. Harmonization of protocols for multi- species organoid platforms to study the intestinal biology of toxoplasma gondii and other protozoan infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* **10**, 610368 (2021).
7. Powell, R. H., Behnke, M. S. WRN conditioned media is sufficient for *in vitro* propagation of intestinal organoids from large farm and small companion animals. *Biology Open.* **6** (5), 698-705 (2017).
8. Li, L. et al. Porcine intestinal enteroids: a new model for studying enteric coronavirus porcine epidemic diarrhea virus infection and the host innate response. *Journal of Virology.* **93** (5), e01682-18 (2019).
9. van der Hee, B., Madsen, O., Vervoort, J., Smidt, H., Wells, J. M. Congruence of transcription programs in adult stem cell-derived jejunum organoids and original tissue during long-term culture. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* **8**, 375 (2020).
10. Barnett, A. M. et al. Porcine colonoids and enteroids keep the memory of their origin during regeneration. *American Journal of Physiology. Cell Physiology.* **320** (5), C794- C805 (2021).
11. Mussard, E. et al. The phenotype of the gut region is more stably retained than developmental stage in piglet intestinal organoids. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* **10**, 983031 (2022).
12. Zhu, M., Qin, Y.-C., Gao, C.-Q., Yan, H.-C, Wang, X.-Q. l-Glutamate drives porcine intestinal epithelial renewal by increasing stem cell activity via upregulation of the EGFR-ERK-mTORC1 pathway. *Food & Function.* **11** (3), 2714-2724 (2020).
13. Wang, Z. et al. Dietary vitamin A affects growth performance, intestinal development, and functions in weaned piglets by affecting intestinal stem cells. *Journal of Animal Science.* **98** (2), skaa020 (2020).
14. Derricott, H. et al. Developing a 3D intestinal epithelium model for livestock species. *Cell and Tissue Research.* **375** (2), 409-424 (2019).
15. Khalil, H. A. et al. A novel culture system for adult porcine intestinal crypts. *Cell and Tissue Research.* **365** (1), 123-134 (2016).
16. Stewart, A. S., Freund, J. M., Gonzalez, L. M. Advanced three-dimensional culture of equine intestinal epithelial stem cells. *Equine Veterinary Journal.* **50** (2), 241-248 (2018).
17. Tsai, Y.-H. et al. A method for cryogenic preservation of human biopsy specimens and subsequent organoid culture. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology.* **6** (2), 218-222.e7 (2018).
18. Wilson, S. S., Tocchi, A., Holly, M. K., Parks, W. C., Smith, J. G. A small intestinal organoid model of non-invasive enteric pathogen-epithelial cell interactions. *Mucosal*

Copyright © 2023 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

Immunology. **8** (2), 352-361 (2015).

19. Li, Y. et al. Next-generation porcine intestinal organoids: an apical-out organoid model for swine enteric virus infection and immune response investigations. *Journal of Virology.* **94** (21), e01006-20 (2020).
20. Moon, C., VanDussen, K. L., Miyoshi, H., Stappenbeck, T. S. Development of a primary mouse intestinal epithelial cell monolayer culture system to evaluate factors that modulate IgA transcytosis. *Mucosal Immunology.* **7** (4), 818-828 (2014).
21. van der Hee, B. et al. Optimized procedures for generating an enhanced, near physiological 2D culture system from porcine intestinal organoids. *Stem Cell Research.* **28**, 165-171 (2018).
22. Hoffmann, P. et al. Intestinal organoid-based 2D monolayers mimic physiological and pathophysiological properties of the pig intestine. *PLoS One.* **16** (8), e0256143 (2021).
23. Vermeire, B., Gonzalez, L. M., Jansens, R. J. J., Cox, E., Devriendt, B. Porcine small intestinal organoids as a model to explore ETEC-host interactions in the gut. *Veterinary Research.* **52** (1), 94 (2021).
24. Luo, H. et al. Utility evaluation of porcine enteroids as PDCoV infection model in vitro. *Frontiers in Microbiology.* **11**, 821 (2020).
25. Resende, T. P., Medida, R. L., Vannucci, F. A., Saqui-Salces, M., Gebhart, C. Evaluation of swine enteroids as in vitro models for Lawsonia intracellularis infection1,2. *Journal of Animal Science.* **98** (2), skaa011 (2020).
26. Engevik, A. C. et al. Editing myosin VB gene to create porcine model of microvillus inclusion disease, with microvillus-lined inclusions and alterations in sodium transporters. *Gastroenterology.* **158** (8), 2236-2249.e9 (2020).
27. Watanabe, K. et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology.* **25** (6), 681-686 (2007).
28. Gracz, A. D., Puthoff, B. J., Magness, S. T. Identification, isolation, and culture of intestinal epithelial stem cells from murine intestine. *Somatic Stem Cells: Methods and Protocols.* **879**, 89-107 (2012).
29. Ferrandis Vila, M. et al. Dietary fiber sources and non- starch polysaccharide-degrading enzymes modify mucin expression and the immune profile of the swine ileum. *PloS One.* **13** (11), e0207196 (2018).
30. Li, L. et al. IFN-lambda 3 mediates antiviral protection against porcine epidemic diarrhea virus by inducing a distinct antiviral transcript profile in porcine intestinal epithelia. *Frontiers in Immunology.* **10**, 2394 (2019).
31. VanDussen, K. L., Sonnek, N. M., Stappenbeck, T. S. L-WRN conditioned medium for gastrointestinal epithelial stem cell culture shows replicable batch-to- batch activity levels across multiple research teams. *Stem Cell Research.* **37**, 101430 (2019).
32. Sutton, K. M., Orr, B., Hope, J., Jensen, S. R., Vervelde, L.Establishment of bovine 3D enteroid-derived 2D monolayers. *Veterinary Research.* **53** (1), 15 (2022)

Copyright © 2023 JoVE Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License

Supplementary Materials

Name	Company	Catalog Number	Comments
0.5 M EDTA, pH 8.0	Thermo Fisher Scientific	AM9260G	Store at room temperature.
15 mL conical tube	Sarstedt	62.554.502	
24-well cell culture plate	Corning	3526	
48-well cell culture plate	Corning	3548	
50 mL polypropylene conical tube	Falcon	352070	
Bovine Serum Albumine (BSA)	Euromedex	A6003	Store at 4 °C.
Centrifuge Universal 320 R	Hettich	1406	
Collagene type IV from human placenta	Sigma	C5533	Prepare the stock solution at 1 mg/ mL in acetic acid according to the manufacturer's recommendation. Aliquot (500 µL) and store at -20 °C.
CoolCell LX Cell Freezing Container	Corning	432003	Used to cryopreserve crypts and organoids.
Countess 3 Automated Cell Counter	Thermo Fisher Scientific	16842556	
Coverslips, 22 mm x 50 mm	VWR	630-1845	
Cryotube ClearLine 1 mL	Clear line	390706	Used to cryopreserve crypts and organoids.
DAPI	Invitrogen	D1306	Prepare the stock solution at 5 mg/mL in water according to the manufacturer's recommendation. Aliquot (20 µL) and store at -20 °C
Dithiothreitol (DTT)	Merck	10197777001	Store at 4 °C.
DMEM, high glucose, GlutaMAX Supplement, pyruvate	Thermo Fisher Scientific	31966047	Store at 4 °C.
DMSO (Dimethyl Sulfoxide)	Corning	25-950-CQC	Store at room temperature.
Epredia Superfrost Plus Adhesion microscopic slide	VWR	631-9483	
Fetal Bovine Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific	10270-106	Store 5 mL aliquots at -20 °C.
Fisherbrand Sterile Cell Strainers	Thermo Fisher Scientific	22363549	Used for crypt isolation.
Fixed Tilt 3D Platform Rotator	VWR	97025-564	Used for incubations in the immunostaining protocol.
Gibco PBS, pH 7.4	Thermo Fisher Scientific	10010015	Store at 4 °C.
Gibco TrypLE Express Enzyme (1x), phenol red	Thermo Fisher Scientific	12605-010	Enzyme dissociation reagent. Store at room temperature.
Goat anti-rabbit IgG, Alexa fluor 488	Thermo Fisher Scientific	A-11008	Secondary antibody. Store at 4 °C. Working dilution 1:1000.
IntestiCult Organoid Growth Medium (Human)	Stem Cell Technology	6010	Organoid culture medium. Store at -20 °C. Thaw the basal medium and organoid supplement at room temperature and mix (1:1). Store the mix at 4 °C for up to 1 week.
Insert with PET membrane transparent Falcon for plate 24 wells	Corning	353095	
Inverted microscope	Nikon	Eclipse TS2	
Matrigel Basement Membrane Matrix	Corning	354234	Tumor-derived extracellular matrix used for the 3D culture of organoids. Matrigel polymerizes at room temperature. Use cooled tips to pipet the Matrigel. Prepare 500 µL aliquots and store at -20 °C.
Mounting medium for fluorescence with DAPI	Vectashield	H1250	Store at 4 °C.
Occludin polyclonal antibody	Thermo Fisher Scientific	71-1500	Primary antibody. Store at -20 °C. Working dilution 1:200.
Paraformaldehyde 32%	Electron microscopy science	15714	Prepare 4% paraformaldehyde (PFA) solution under chemical hood by adding 5 mL of 32% PFA to 35 mL of PBS. Aliquot by 10 mL and store at -20 °C.

Penicillin-Streptomycin	Sigma	P4333	Antibacterial. Store 5 mL aliquots at -20 °C.
Phalloidin TRITC	Sigma	P1951	Probe for actin staining. 1 mg/mL stock solution. Store at 4 °C.
Primocin	InvivoGen	ant-pm-05	Antimicrobial agent for primary cells acting on bacteria, mycoplasma and fungi. Store at -20 °C.
ROCK Inhibitor (Y27632)	ATCC	ACS-3030	Used to maintain the stem cells. Prepare the stock solution at 10 mM in sterile water according to the manufacturer's recommendation and store aliquots (50 µL) at -20 °C.
Rotating shaker mix XL	Clear line	062646CL	Used for crypt isolation.
Stripette Serological Pipets 10 mL	Corning	4488	
Tissue Culture Dish	TPP	93100	
Triton X100	Sigma	8787	Store at room temperature.
Trypan Blue stain 0.4%	Thermo Fisher Scientific	T10282	Store at room temperature.
Vacuum system Vacusip	Integra	159000	Used to remove the medium of organoid wells.

Données complémentaires de l'article 2

I - Comparaison de l'expression de gènes dans les cellules d'organoïdes de jéjunum de porcelets allaités en fonction du format de culture : 3D ou 2D

Nous avons fait l'hypothèse que le format de culture pourrait modifier le phénotype des cellules épithéliales des organoïdes intestinaux de porcelets. En effet, l'organisation en 3D des organoïdes est perdue lors de la culture des cellules en monocouches, ce qui modifie probablement les communications entre les cellules et les forces mécaniques s'exerçant sur les cellules. De plus, le milieu de culture des monocouches de cellules d'organoïdes que nous avons utilisé est supplémenté avec 20% de SVF ce qui pourrait influencer le phénotype des cellules via une concentration plus élevée de facteurs de croissances. Enfin, contrairement aux organoïdes 3D, l'accès des nutriments se fait via le pôle basal et le pôle apical dans les monocouches de cellules.

Quelques études ont étudié la différence d'expression de gènes entre des organoïdes 3D et des monocouches de cellules d'organoïdes, cependant il existe certaines contradictions et des différences entre les espèces. Une étude chez l'homme a montré des profils d'expression globalement similaires (14/16 gène étudiés) entre les organoïdes 3D dérivés d'iPSC et les monocouches 2D, mais avec une expression réduite des gènes marqueurs de cellules sécrétrices *MUC2* et *LYZ* dans les monocouches (*Takahashi et al., 2021*). Un étude chez le cheval a également montré que les cellules d'organoïdes intestinaux cultivés en 2D expriment plus faiblement *MUC2* et *LYZ* que dans le format en 3D (*Hellman, 2021*). Un autre article sur des organoïdes de duodénum humain a également montré une moindre expression du gène *LYZ* mais pas du gène *MUC2* en 2D par rapport à la culture en 3D (*Holthaus et al., 2021*). Cette publication a aussi montré une diminution de gènes marqueurs des cellules souches (*LGR5, OLMF4*) et une augmentation de gènes marqueurs des cellules absorbantes (*PEPT1*, *FABP2*, *SI*) dans les monocouches (*Holthaus et al., 2021*). Cette étude a décrit des résultats similaires pour des organoïdes et des monocouches de duodénum porcins. Enfin, des données chez le bovin n'ont pas montré de différence d'expression des gènes *MUC2, CHGA, LYZ, LGR5* entre les organoïdes 3D et les monocouches (*Sutton et al., 2022*).

Nous avons donc comparé l'expression des gènes marqueurs de différents types cellulaires et des fonctions de barrière et d'absorption des nutriments de l'épithélium intestinal en fonction du format de culture 3D ou 2D des cellules d'organoïdes de jéjunum de porcelets allaités.

Matériels et Méthodes

Des organoïdes de jéjunum de porcelets allaités ont été cultivés en 3D dans du milieu IntestiCult™ OGM (n = 3 porcelets) comme décrit précédemment dans l'article 1 (*Mussard et al., 2022*), ou en monocouche dans du milieu IntestiCult™ OGM supplémenté avec 20 % de SVF (n = 6 porcelets) comme décrit dans l'article 2 (*Mussard et al., 2023*). L'expression des gènes a été mesurée dans les organoïdes 3D et dans les cellules cultivées en monocouche par qPCR en temps réel à l'aide du système microfluidique Biomark en utilisant une puce 96.96 Dynamic Arrays IFC (Fluidigm), comme décrit précédement (*Mussard et al., 2022*). Les données ont été normalisées par rapport au gène de référence *B2M* (ΔCT), exprimé de manière stable entre les organoïdes 3D et les monocouches. Les analyses statistiques ont été réalisées sur les données d'expression relatives $2^{-\Delta Ct}$ à l'aide du logiciel R (version 4.1.1) en utilisant des modèles linéaires. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque la valeur p ajustée était ≤ 0,05. Les expressions relatives ont ensuite été représentées sous forme de heatmap à l'aide du package pheatmap (version 1.0.12) en utilisant la méthode de clusterisation « complete » et les distances euclidiennes pour le regroupement.

Résultats

Nous avons analysé l'expression de 82 gènes dans les organoïdes 3D et les monocouches dérivées de jéjunum de porcelet allaités. 33 gènes sur 82 analysés (40 %) étaient différentiellement exprimés entre les organoïdes 3D et les monocouches 2D (***Figure 49***). Les organoïdes 3D exprimaient plus fortement des gènes marqueurs des cellules souches (*SOX9, SMOC2, LGR5*), de la prolifération (*PCNA, MKI67*), de l'activation de la voie Notch (*HES1),* des cellules en gobelet (*SPDEF, REG4, MUC2, TFF3*) et entéroendocrines (*CHGA*), un gène codant une protéine de jonctions serrées (*CLDN2*) et des gènes impliqués dans l'immunité innée (*DUOXA2, GPX1, GPX2, SOD1, SOD2, TLR5, NFKB1, NFBK2, TNFSF13, CCL5*) et le transport d'ions (*CFTR, NHE3*). Au contraire, les monocouches exprimaient plus fortement un gène impliqué dans la différenciation des cellules en gobelet (*KLF4*), des gènes marqueurs des entérocytes (*ALPI, KRT20, VIL1*), des gènes codant pour des transporteurs de nutriments (*SLC7A11, GLUT2*) et pour une enzyme digestive (*DPP4*) et une mucine transmembranaire (*MUC13*).

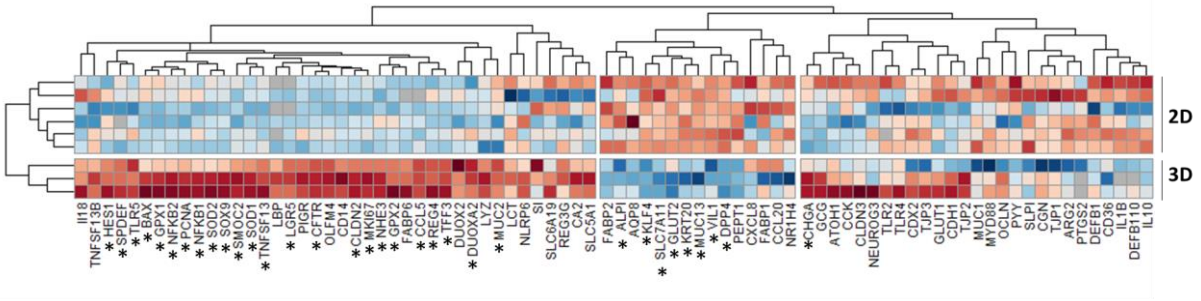


FIGURE 49 : COMPARAISON DE L'EXPRESSION DE GENES DANS DES ORGANOÏDES DE JEJUNUM DE PORCELETS ALLAITES CULTIVES EN 3 DIMENSIONS OU EN MONOCOUCHE.

La heatmap représente l'expression relative des gènes (colonnes) dans des organoïdes de jéjunum cultivés en 3 dimensions (3D, n = 3 porcelets allaités) ou en monocouches en 2 dimensions (2D, n = 6 porcelets allaités). La couleur représente l'expression relative centrée-réduite pour chaque gène avec les valeurs les plus faibles en bleu et les valeurs les plus élevées en rouge. Les gènes (colonnes) et les échantillons (lignes) ont été clustérisés. * : différence significative entre les organoïdes 3D et 2D (valeur p ajusté ≤ 0,05).

Discussion

Nos résultats suggèrent une moindre prolifération des cellules dans les monocouches par rapport aux organoïdes 3D. En accord avec ces données, nous n'avons pas détecté de cellules en prolifération dans les monocouches 72 heures après ensemencement (marquage EdU, données non montrées), contrairement à ce que nous avons observé dans les organoïdes 3D (données supplémentaires article 1). Ces différences pourraient peut-être s'expliquer par l'arrêt de la prolifération des cellules une fois la confluence atteinte dans les inserts de culture. Nous avons également observé que les monocouches expriment plus fortement des gènes marqueurs des entérocytes (cellules absorbantes), tandis que les organoïdes 3D expriment plus fortement des gènes marqueurs des cellules sécrétrices. Nous avons également observé une moindre expression de gènes impliqués dans les défenses épithéliales innés dans les monocouches par rapport aux organoïdes 3D, probablement en raison des différences de proportion des types cellulaires entre les deux formats de culture. A l'inverse de nos résultats et de la plupart des données de la littérature, une étude sur des organoïdes d'iléon de porc a montré une augmentation de l'expression des gènes marqueurs des cellules souches et de la prolifération (*SOX9, PCNA*) et d'un gène marqueur des cellules en gobelet (*MUC2*) en 2D par rapport aux organoïdes 3D (*van der Hee et al., 2018*). Ces différences pourraient s'expliquer par la différence des milieux de culture utilisés (milieu conditionné vs IntestiCult™ OGM).

Conclusion

Globalement, notre modèle de monocouches de cellules d'organoïdes de jéjunum de porc semble donc particulièrement adapté pour étudier les fonctions de l'épithélium intestinal impliquant les cellules absorbantes telle que l'absorption de nutriments (*van der Hee et al., 2020*). Des optimisations des conditions de cultures seraient souhaitables pour étudier d'autres fonctions de l'épithélium intestinal telles que la sécrétion d'entérohormones, de mucus ou de peptides antimicrobiens. La culture des monocouches en présence de DAPT, un inhibiteur de la voie Notch, pourrait permettre de favoriser la différenciation des cellules en cellules sécrétrices et ainsi d'étudier les fonctions de sécrétion de l'épithélium (*Moon et al., 2014*).

II – Caractérisation de la cinétique de mise en place de la fonction de barrière dans le modèle de monocouches de cellules d'organoïdes de jéjunum de porcelets allaités

Dans l'article 2, les mesures de TEER ont été réalisées manuellement toutes les 24 heures à l'aide d'un volt-ohmmètre EVOM3 (World precision instrument) équipé d'une électrode (STX2-PLUS). Cette méthode de mesure ne permet pas d'étudier précisément la cinétique de mise en place de la barrière épithéliale dans notre modèle de monocouches de cellules d'organoïdes de porcelets. L'acquisition d'un appareil CellZScope (Nanoanalytics) dans notre laboratoire nous a permis de réaliser des mesures de la TEER en continu afin de caractériser finement la cinétique d'évolution des TEER des monocouches de cellules d'organoïdes d'iléon de porcelets allaités.

Matériels et Méthodes

Des cellules d'organoïdes d'iléon de 2 porcelets allaités ont été cultivées indépendamment selon la méthode décrite précédemment pour le jéjunum (*Mussard et al., 2023*). Les cellules ont été cultivées pendant 24h avec de l'IntestiCult^{TM} OGM supplémenté avec 20 % SVF et 10 µM de Y27632. Le volume du compartiment basal (770 µL) et apical (400 µL) a été ajusté pour permettre les mesures de TEER toutes les 30 min à l'aide du CellZScope. Après 2 ou 3 jours de culture, le milieu de culture du compartiment basal a été renouvelé (sans Y27632) et celui du pôle apical a été remplacé par du PBS.

Résultats et Discussion

La TEER a commencé à augmenter à partir d'environ 10 heures après l'ensemencement ce qui suggère qu'à ce stade les cellules sont adhérentes et confluentes, limitant ainsi les flux d'ions au travers du tapis cellulaire (***Figure 50***). La TEER maximale a été atteinte après environ 48 heures de culture (> 1 500 Ω.cm²) suggérant la fin de la phase de mise en place des jonctions serrées. La vitesse d'augmentation de la TEER dans nos monocouches d'iléon semble plus rapide que celle décrite dans la littérature sur des monocouches d'organoïdes d'iléon de porc, probablement en raison du nombre de cellules ensemencées plus élevé dans notre cas (*van der Hee et al., 2018*). La TEER ne montre pas de véritable phase de plateau et commence à diminuer après 48 heures de culture. De plus, la TEER semble fortement perturbée par le changement de milieu (coïncidant avec le remplacement du milieu du pôle apical par du PBS). Cependant, les tapis restent confluents avec des TEER autour de 500 Ω.cm². Nous avons également observé une variabilité assez importante des mesures de TEER entre les individus mais aussi entre les puits (réplicats techniques). Cependant, ces différences semblent s'atténuer au cours du temps.

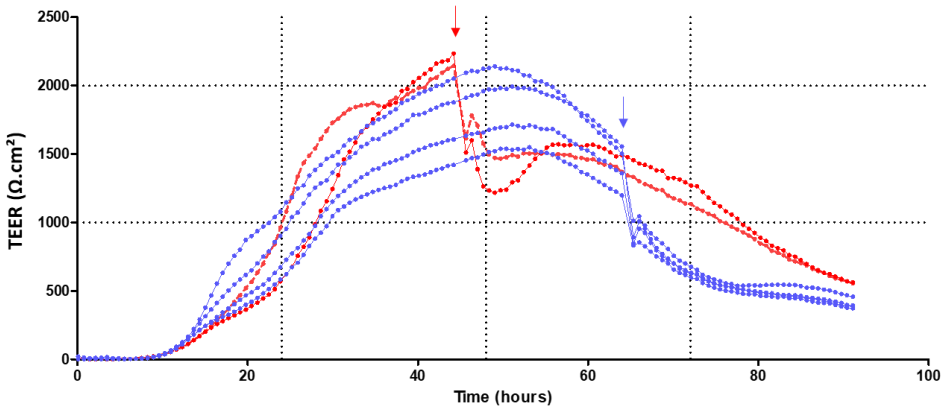


FIGURE 50 : MESURE EN CONTINU DE LA RESISTANCE ELECTRIQUE TRANSEPITHELIALE DE MONOCOUCHES DE CELLULES D'ORGANOÏDES D'ILEON DE PORCELETS.

La résistance électrique transépithéliale a été mesurée lors de deux expériences indépendantes menées sur des cellules d'organoïdes d'iléon issus de deux porcelets allaités (rouge : n = 2 inserts, bleu : n = 4 inserts). Les flèches indiquent le changement du milieu (rouge : 2 jours après ensemencement, bleu : 3 jours après ensemencement).

Conclusion

Globalement, la mesure en continu de la TEER des monocouches d'organoïdes d'iléon confirme les résultats obtenus par les mesures manuelles présentées dans l'article 2 (*Mussard et al., 2023*). Ces résultats seront à confirmer pour les autres segments digestifs. L'étude de la cinétique de la TEER pourrait être utile pour définir le meilleur moment pour traiter les cellules. Par exemple, pour étudier les effets d'un traitement sur le développement de la barrière épithéliale, il serait intéressant de traiter les cellules entre 24 et 48h, au moment de la mise en place des jonctions serrées. En revanche, des résultats plus reproductibles pourraient être obtenus à des temps plus tardifs (>72h), lorsque la variabilité semble réduite. Enfin, la stabilité à plus long terme de la TEER des monocouches de cellules d'organoïdes d'intestin de porcelets reste à déterminer.

Effets de produits dérivés de micro-organismes sur un modèle de monocouches de cellules d'organoïdes intestinaux de porcelets

Article 3

Effets de produits dérivés de micro-organismes sur des monocouches de cellules dérivées d'organoïdes de jéjunum de porcelets

En préparation

Eloïse Mussard[1,2], Caroline Achard[2], Corinne Lencina[1], Laurent Cauquil[1], Sylvie Combes[1] and Martin Beaumont[1]

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

[2]Lallemand Animal Nutrition, Blagnac Cedex, France

Le dernier objectif de la thèse était d'apporter la preuve de concept que notre modèle de monocouches de cellules d'organoïdes d'intestin de porcelet pouvait être utilisé pour étudier les effets de produits dérivés de micro-organismes sur l'épithélium intestinal.

Le premier objectif de cette étude était de tester les effets de trois produits dérivés de micro-organismes : deux postbiotiques développés par l'entreprise Lallemand, l'un dérivé de levures (**YANG**) et l'autre dérivé de bactéries (***L.* helveticus**) ainsi que du **butyrate**, un métabolite produit par le microbiote intestinal dont les effets sur l'épithélium ont été décrit dans divers modèles. Les effets de ces produits ont été testés sur des monocouches de cellules d'organoïdes de jéjunum de porcelets allaités et cultivées dans des **conditions de culture mimant ou non l'environnement des cellules souches** (***Figure 51***). Le deuxième objectif de l'étude était d'étudier les effets des produits dérivés de micro-organismes dans le contexte d'une **dysfonction de la barrière épithéliale**, comme observé au moment du sevrage chez le porcelet. Pour cela, nous avons mis en place des challenges avec un cocktail de **cytokines pro-inflammatoires** ou avec la **mycotoxine DON** (***Figure 51***).

Les TEER et l'expression des gènes dans les monocouches de cellules d'organoïdes de jéjunum de porcelets (n = 5-7) ont été analysés afin d'évaluer les effets de produits dérivés de micro-organismes et des challenges. Nos résultats montrent que le butyrate a renforcé la barrière épithéliale et modulé l'expression de gènes impliqués dans les réponses immunitaires innées, quel que soit les conditions de culture. Cependant, certains des effets du butyrate divergeaient en fonction des conditions de culture mimant ou non la niche des cellules souches. Ces résultats pourraient s'expliquer par le « paradoxe du butyrate » qui implique une utilisation différente de ce métabolite en fonction du niveau de différenciation des cellules épithéliales. Les postbiotiques YANG et *L. helveticus* ont eu quelques effets sur la barrière épithéliale mais uniquement dans les conditions de culture mimant la niche des cellules souches. Le challenge avec les cytokines pro-inflammatoires a eu très peu d'effets sur les paramètres mesurés alors que la mycotoxine DON a induit une dysfonction de la barrière épithéliale reproduisant *in vitro* certaines des perturbations observées *in vivo* au moment du sevrage chez les porcelets. Le YANG et *L. helveticus* n'ont pas prévenu les effets du challenge induit par le DON alors que le butyrate a nettement amplifié ou réduit certains des effets de cette mycotoxine.

En conclusion, nos résultats montrent que les monocouches de cellules d'organoïdes de jéjunum de porcelet peuvent être utilisées pour mettre en évidence les effets de produits dérivés de micro-organismes sur l'épithélium intestinal. Nous avons également mis en place un modèle de dysfonction de la barrière épithéliale induit par la mycotoxine DON. L'induction d'une réaction inflammatoire par un cocktail de cytokines reste cependant à améliorer. Enfin, la forte influence des conditions de culture sur les effets des produits testés pourrait être exploitée pour comprendre leurs modes d'actions, en lien notamment avec la composition cellulaire et le niveau de différenciation.

*Les données issues de cette dernière partie de la thèse sont présentées sous la forme de 5 expériences (**Figure 51**) décrites dans un article rédigé en français et dans lequel les résultats et la discussion sont présentés conjointement.*

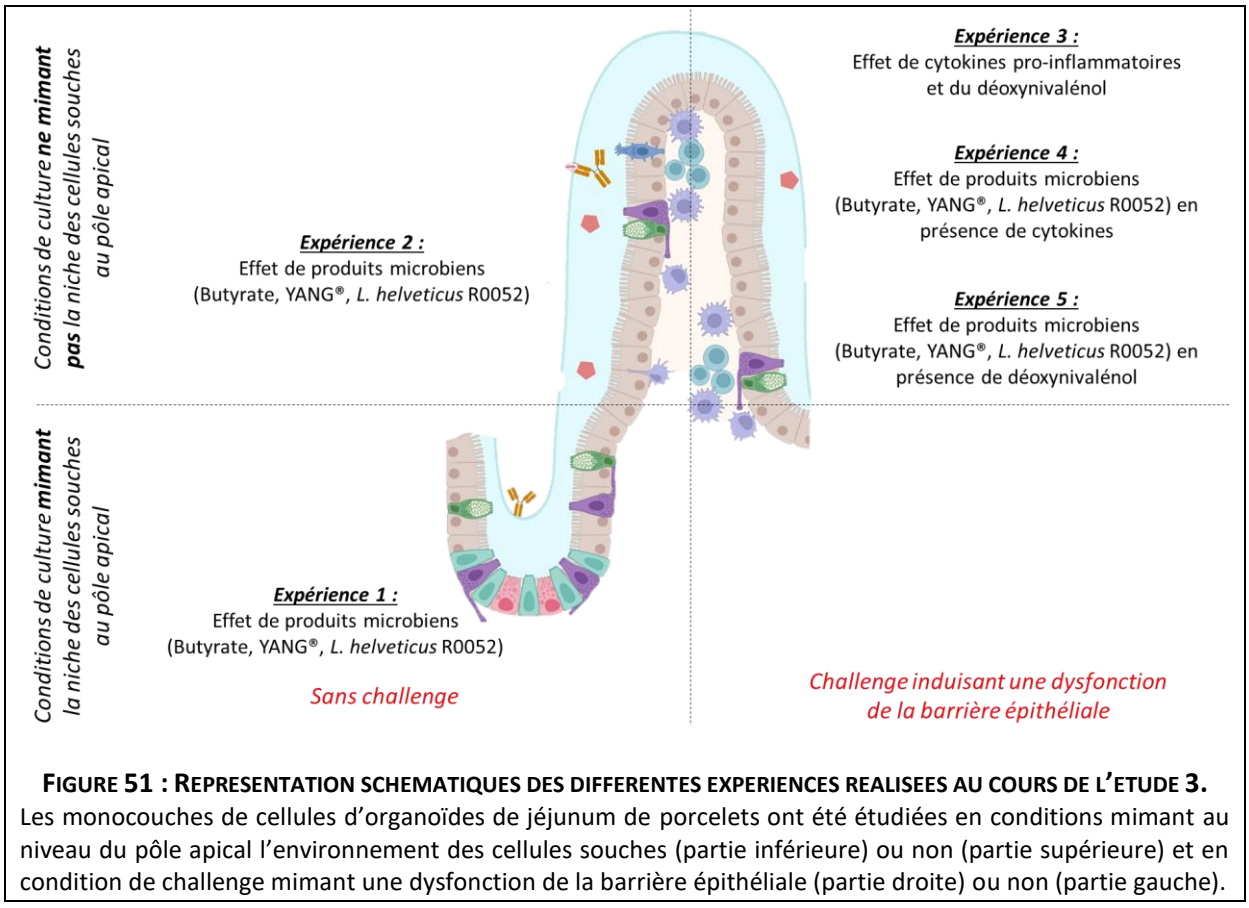


FIGURE 51 : REPRESENTATION SCHEMATIQUES DES DIFFERENTES EXPERIENCES REALISEES AU COURS DE L'ETUDE 3.
Les monocouches de cellules d'organoïdes de jéjunum de porcelets ont été étudiées en conditions mimant au niveau du pôle apical l'environnement des cellules souches (partie inférieure) ou non (partie supérieure) et en condition de challenge mimant une dysfonction de la barrière épithéliale (partie droite) ou non (partie gauche).

Introduction

Les antibiotiques sont couramment utilisés en élevage conventionnel pour prévenir les diarrhées post-sevrage chez le porcelet. Cette pratique contribue à l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques. C'est pourquoi la recherche d'alternatives permettant de renforcer la santé digestive des porcelets sans utiliser d'antibiotique est très active. Une des pistes les plus prometteuses est l'utilisation de **postbiotiques qui sont des produits à base de micro-organismes inactivés ou de leurs composants apportant un bénéfice en terme de santé** (*Salminen et al., 2021*). Cependant, les effets des postbiotiques sur l'épithélium intestinal du porcelet sont peu connus, notamment en raison du manque de modèles appropriés pour les étudier.

Dans ce contexte, nous avons développé un modèle de culture en monocouche de cellules d'organoïdes d'intestin de porcelets. Ce modèle permet d'étudier les effets de produits dérivés de micro-organismes sur la fonction de barrière de l'épithélium intestinal. En effet, la culture en monocouche permet d'exposer les cellules intestinales aux produits à tester par leur pôle apical (*Mussard et al., 2023*). En comparaison avec les lignées cellulaires classiquement utilisées, les monocouches de cellules d'organoïdes présentent l'avantage d'être directement issues de cellules souches, de ne pas présenter d'anomalies génomiques et d'être composées de divers types de cellules épithéliales.

Les organoïdes intestinaux permettent de modéliser un segment spécifique de l'intestin. En effet, nous avons montré que les organoïdes 3D de porcelets maintiennent *in vitro* certaines des caractéristiques de leur segment digestif d'origine (*Mussard et al., 2022*). Ici, nous avons fait le choix d'utiliser **des cellules d'organoïdes de jéjunum** dans la mesure où ce segment proximal de l'intestin est probablement l'un des plus exposés aux postbiotiques qui sont apportés par l'alimentation. De plus, la fonction de barrière du jéjunum est particulièrement perturbée au moment du sevrage chez le porcelet (*Moeser et al., 2007a*).

Des études chez l'homme ont montré que le stade de développement dont sont issues les cellules à l'origine des organoïdes (pédiatrique ou adulte) influence la fonction de barrière dans des modèles de monocouches de cellules d'organoïdes (*Senger et al., 2018; Noel et al., 2021*). Bien que cette observation n'ait pas encore été vérifiée dans notre modèle de monocouches, nous avons choisi de travailler avec des cellules d'**organoïdes dérivées de jéjunum de porcelets allaités**, afin d'utiliser des cellules issues de l'épithélium intestinal encore en développement au moment du sevrage.

Dans cette étude, nous avons testé les effets de **trois produits dérivés de micro-organismes** sur l'épithélium intestinal de porcelet. D'abord, nous avons testé les effets du **butyrate**, un métabolite bactérien dont la production par le microbiote augmente après le sevrage chez le porcelet (*van Beers-Schreurs et al., 1998*). Ce métabolite est une source d'énergie importante pour les cellules épithéliales intestinales matures et favorise la différenciation cellulaire (*van der Hee and Wells, 2021*). Des études antérieures ont décrit des effets bénéfiques du butyrate sur la fonction de barrière dans des modèles *in vitro de* lignées cellulaires (*Peng et al., 2007; Yan and Ajuwon, 2017*) ou d'organoïdes de duodénum humain (*Pearce et al., 2020*). Cependant, les effets du butyrate sur des cellules d'organoïdes de porc cultivées en monocouche n'ont pas encore été documenté. L'autre intérêt de tester le butyrate dans notre nouveau modèle est de pouvoir comparer les résultats obtenus avec les nombreuses études publiées à ce sujet dans d'autres modèles cellulaires. Au cours de cette étude, nous avons également testé **deux postbiotiques développés par la société Lallemand**. Nous avons étudié les effets d'un dérivé de plusieurs souches de levures appelé **YANG (Yeast Association New Generation)**, constitué de parois et d'extraits de cytoplasme de deux souches de *Saccharomyces cerevisiae* et d'une souche de *Cyberlindnera jadinii* (*Upadhaya et al., 2019; Rawling et al., 2021*). Nous avons aussi étudié les effets

de la bactérie probiotique tyndallisée ***Lactobacillus helveticus* R0052 (*L. helveticus*)** (*Johnson-Henry et al., 2007; Wine et al., 2009; Piqué et al., 2019*). Les effets directs de ces deux postbiotiques sur l'épithélium intestinal du porcelet ne sont pas connus.

Le premier objectif de cette étude était d'étudier les effets des trois produits dérivés de micro-organismes (butyrate, YANG et *L. helveticus*) sur les cellules épithéliales intestinales de porcelet. Nous avons supposé que les effets des produits testés pourraient être différents en fonction du **niveau de différenciation** des cellules épithéliales. Nous avons donc testé les produits avec ou sans les facteurs souches favorisant la prolifération au niveau du pôle apical. Le second objectif de l'étude était d'étudier les effets des produits dérivés de micro-organismes sur les cellules épithéliales intestinales de porcelet en condition de **challenge entrainant une dysfonction de la barrière épithéliale,** comme observé lors du sevrage chez le porcelet. Pour cela nous avons testé différents challenges avec (i) des pathogènes inactivés par la chaleur (*Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium)*, (ii) du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), (iii) un cocktail de cytokines pro-inflammatoires ou (iv) la mycotoxine déoxynivalénol (DON). Ces challenges ont été choisis de manière à mimer certains des facteurs impliqués dans la dysfonction de la barrière épithéliale lors du sevrage chez les porcelets : l'exposition à des pathogènes entériques, le stress oxydant, l'inflammation intestinale ou la consommation de céréales potentiellement contaminées par des mycotoxines, respectivement (*Pinton and Oswald, 2014; Gresse et al., 2017*). Les pathogènes inactivés n'ont pas eu d'effet sur les paramètres mesurés, tandis que l'H_2O_2 détruisait les tapis cellulaires. Nous avons donc choisi de tester les effets des produits dérivés de micro-organismes en présence du cocktail de cytokines pro-inflammatoires et du DON.

Matériels et Méthodes

Isolement et cryoconservation des cryptes intestinales de jéjunum de porcelet

Des cryptes issues du jéjunum de porcelets allaités de 21 jours ont été isolées selon la procédure décrite précédemment (*Mussard et al., 2022, 2023*). Les cryptes ont ensuite été congelées dans un milieu contenant du DMEMc [DMEM, 10 % sérum de veaux fœtal (SVF), 1 % pénicilline/streptomycine (P/S)] supplémenté avec 10% SVF, 10 % dimethyl sulfoxide (DMSO) et 10 µM Y27632 (inhibiteur ROCK).

Décongélation des cryptes et des organoïdes de jéjunum de porcelet

Les cryptes épithéliales de jéjunum de porcelets allaités ont été décongelées selon le protocole précédemment décrit (*Mussard et al., 2023*). Brièvement, les cryptes ont été rapidement décongelées à 37 °C puis ensemencées dans des dômes de 25 µL de Matrigel®. Après polymérisation, 250 µL de milieu IntestiCult™ Organoids Growth Medium (Human) (Stem Cell Technologies) ont été ajoutés. Le milieu de culture a été changé tous les 2-3 jours. Les organoïdes résultants ont été congelés comme décrit précédemment (*Mussard et al., 2023*) après un premier passage, puis ont été décongelés comme décrit ci-dessus.

Maintien en culture des organoïdes de jéjunum

Un premier passage a été réalisé après 10 jours de culture pour les organoïdes issus de la décongélation des cryptes, ou après 3 jours lors de la décongélation des organoïdes. Le passage des organoïdes a été effectué comme décrit précédemment (*Mussard et al., 2023*). Brièvement, les organoïdes ont été lavés avec du PBS et incubés pendant 5 min à 37 °C dans du TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) supplémenté avec 10 µM de Y27632. Les organoïdes ont été dissociés par pipetage à l'aide d'une pipette P1000 jusqu'à obtenir une suspension de cellules isolées. Les cellules dissociées issues de plusieurs puits ont été regroupées dans du DMEMc et centrifugées à 500 g, 4 °C pendant 5 min. Le

culot a été resuspendu dans du DMEMc et les cellules ont été comptées à l'aide d'un compteur de cellules (Countness 3). Le volume nécessaire pour ensemencer 3 000 cellules par puits a été centrifugé à 500 g, 4 °C pendant 5 min. Les cellules ont été resuspendues dans le Matrigel® (dilué 1:3 dans du DMEMc) puis des dômes de 50 µL ont été déposés dans des plaques 24 puits. Après polymérisation, 500 µL de milieu IntestiCult™ Organoids Growth Medium (Human) a été ajouté dans les puits. Le milieu a été changé tous les 2-3 jours.

Etablissement de monocouches de cellules épithéliales dérivées d'organoïde de jéjunum

Les monocouches de cellules épithéliales ont été obtenues à partir d'organoïdes de jéjunum de porcelets cultivés en 3D pendant 5 jours après un passage selon le protocole décrit précédemment (*Mussard et al., 2023*). Brièvement, des inserts de culture (0.33 cm^2) ont été pré-traités avec du collagène de type IV dilué à 50 µg/mL dans du PBS. Les puits ont été incubés à 37 °C au moins 3 heures puis la solution a été retirée et les puits ont été séchés à l'air libre. Les organoïdes ont été récupérés et regroupés dans du DMEMc puis centrifugés à 500 g, 4 °C pendant 5 min. Les organoïdes ont été dissociés en cellules isolées et comptées comme décrit précédemment pour le passage des organoïdes. Le volume nécessaire pour ensemencer $2{,}5.10^5$ cellules par puits a été centrifugé à 500 g, 4 °C pendant 5 min. Les cellules ont été resuspendues dans du milieu IntestiCult™ Organoids Growth Medium (Human) supplémenté avec 20 % de SVF et 10 µM Y27632, puis 200 µL de milieu contenant les cellules a été déposé au pôle apical des inserts de culture pré-traités avec le collagène. 500 µL du même milieu a été ajouté au niveau du compartiment basal. Après 24 heures, le milieu de culture apical des cellules a été retiré et les tapis ont été traités comme décrit dans la section suivante. Le milieu basal a été renouvelé tous les jours avec du milieu IntestiCult™ Organoids Growth Medium (Human) supplémenté avec 20 % de SVF mais sans Y27632, nécessaire uniquement en début de culture quand les cellules sont dissociées.

Traitement apical des monocouches de cellules épithéliales dérivées d'organoïdes de jéjunum

Les schémas expérimentaux des différentes expériences sont présentés dans la ***Figure 1***. Pour toutes les expériences, des tapis de cellules d'organoïdes de jéjunum de porcelets allaités (n = 7, les cellules des mêmes porcelets allaités ont été utilisées pour toutes les expériences) ont été traités au niveau du pôle apical 24 h après ensemencement. Des duplicats techniques (deux tapis issus du même porc) ont été réalisés lorsque le nombre de cellules obtenues lors de la dissociation était suffisant.

Le but de l'**expérience 1** était de tester les effets des produits dérivés de micro-organismes dans des conditions de culture mimant la niche des cellules souches. Les monocouches ont été traitées au pôle apical pendant 24 heures avec du PBS (témoin négatif) ou du butyrate (1 mM) ou du YANG (100 µg/mL) ou *L. helveticus* (10^8 cellules/mL) dans de l'IntestiCult™ OGM + 20 % de SVF. Ces traitements ont été renouvelés après 24h. La concentration de butyrate a été choisie à partir des résultats d'une étude réalisée sur des monocouches de cellules d'organoïdes intestinaux humains (*Pearce et al., 2020*). La concentration utilisée pour le YANG a été définie à l'aide de résultats obtenus par la société Lallemand montrant dans ces conditions l'absence de toxicité et des effets sur des cellules immunitaires en culture (monocytes). La concentration en *L. helveticus* a été définie selon les concentrations utilisées dans la littérature pour d'autres types de bactéries inactivés (bactéries lactiques) (*Habil et al., 2014; Zeng et al., 2016; Salminen et al., 2021; Foey et al., 2022*).

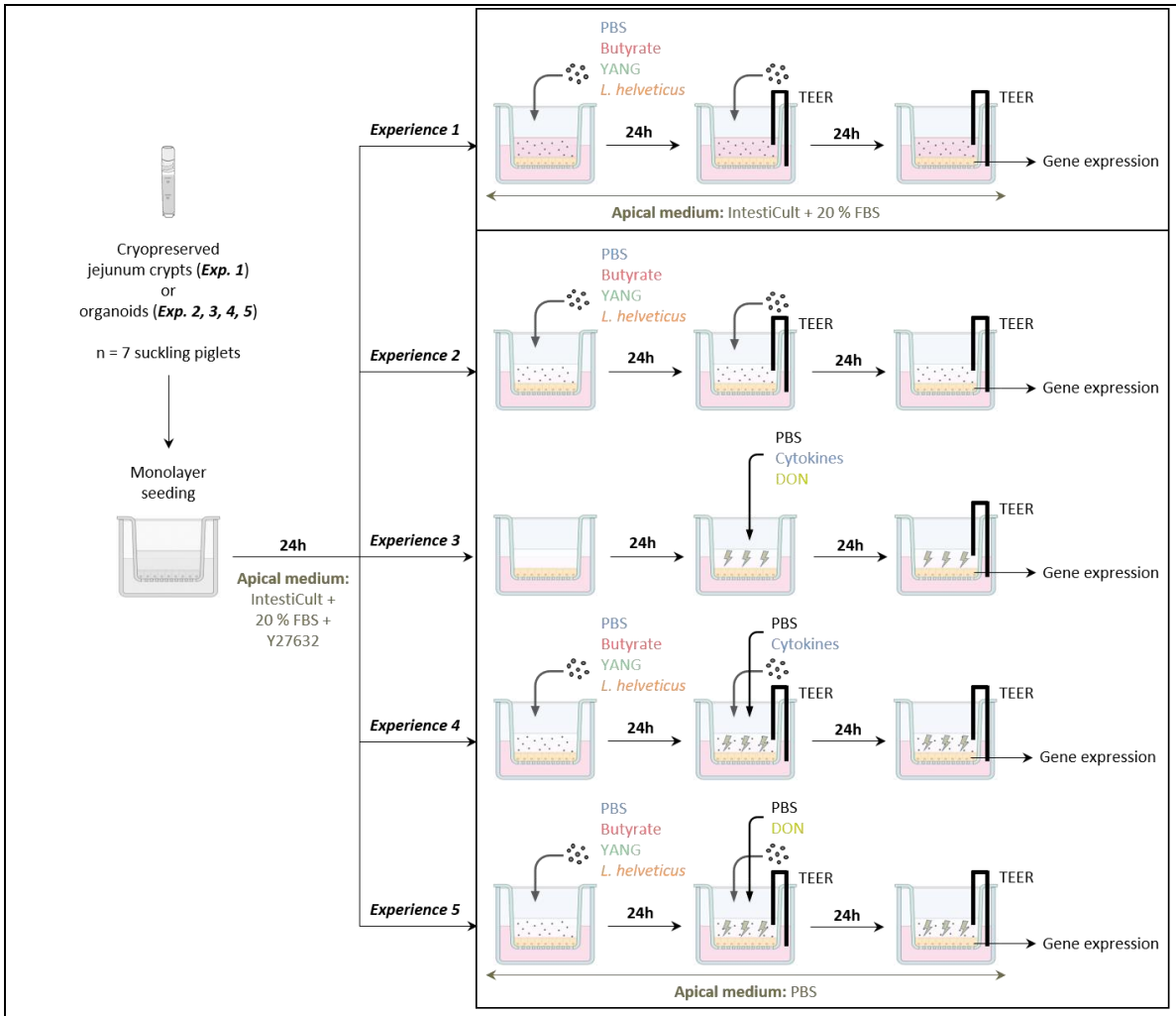


FIGURE 1 : SCHEMAS EXPERIMENTAUX DES DIFFERENTES EXPERIENCES.

Des monocouches de cellules dérivées d'organoïdes de jéjunum de porcelets allaités (n = 7, les cellules des mêmes porcelets allaitées ont été utilisées pour toutes les expériences) ont été cultivées dans de l'IntestiCult™ OGM + 20 % SVF + 10 µM Y27632 pendant 24 heures puis ont été traitées au niveau du pôle apical. **Expérience 1 :** Test de produits issus de micro-organismes dans un milieu de culture mimant l'environnement des cryptes épithéliales. Les cellules ont été traitées par du PBS (témoin négatif) ou du butyrate (1 mM) ou du YANG (100 µg/mL) ou *L. helveticus* (10^8 cellules/mL) dans de l'IntestiCult™ OGM + 20 % de SVF (mimant la niche des cellules souches). Les traitements ont été renouvelés après 24h. **Expérience 2 :** Test de produits issus de micro-organismes dans du PBS au pôle apical afin de réduire la concentration des facteurs souches. Les cellules ont été traitées par du PBS (témoin négatif) ou du butyrate (1 mM) ou du YANG (100 µg/mL) ou *L. helveticus* (10^8 cellules/mL) dans du PBS. Les traitements ont été renouvelés après 24h. **Expérience 3 :** Test du challenge avec un cocktail de cytokines pro-inflammatoires ou avec du déoxynivalénol (DON) dans du PBS au pôle apical. Les cellules ont été traitées pendant 24 heures par du PBS. Les cellules ont ensuite été traitées au pôle apical avec du PBS (témoin négatif) ou des cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL1-β, IL-6 : 50 ng/mL) ou du DON (100 µM). **Expérience 4 :** Test de produits issus de micro-organismes en conditions de challenge induit par un cocktail de cytokines pro-inflammatoires dans du PBS au pôle apical. Les cellules ont été traitées par du PBS (témoin négatif) ou du butyrate (1 mM) ou du YANG (100 µg/mL) ou *L. helveticus* (10^8 cellules/mL) dans du PBS. Les traitements ont été renouvelés après 24h en présence de PBS (témoin négatif) ou de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL1-β, IL-6 : 50 ng/mL) dans du PBS. **Expérience 5 :** Test de produits issus de micro-organismes en conditions de challenge induit par le DON dans du PBS au pôle apical. Les cellules ont été traitées par du PBS (témoin négatif) ou du butyrate (1 mM) ou du YANG (100 µg/mL) ou *L. helveticus* (10^8 cellules/mL). Les traitements ont été renouvelés après 24h en présence de PBS (témoin négatif) ou de DON (100 µM). Pour toutes les expériences, la TEER a été mesurée toutes les 24h. L'expression des gènes a été analysée après 48h de traitement. *FBS : fetal bovine serum*

Les ***expériences 2, 3, 4 et 5*** ont été réalisées simultanément. Les tapis cellulaires ont été lavés deux fois au pôle apical avec du PBS 24h après ensemencement et tous les traitements ont été réalisés dans du PBS au pôle apical de manière à réduire la concentration des facteurs souches et pour favoriser la différenciation des cellules. La préparation des traitements dans le PBS permettait également de s'affranchir d'éventuelles interactions entre les produits testés et les composés du milieu de culture.

Le but de l'**expérience 2** était de tester les effets des produits dérivés de micro-organismes sans facteurs souches au niveau du pôle apical, de manière à favoriser la différenciation. Les tapis cellulaires ont été traités pendant 24 heures par du PBS (témoin négatif), du butyrate (1 mM), du YANG (100 µg/mL) ou *L. helveticus* (10^8 cellules/mL). Ces traitements ont été renouvelés après 24h.

Le but de l'**expérience 3** était de tester les effets de challenges sur la fonction de barrière de l'épithélium. 24 heures après l'ensemencement des cellules, le milieu apical a été remplacé pendant 24 heures par du PBS puis les cellules ont été traitées au pôle apical pendant 24 heures. Le PBS a été utilisé comme témoin négatif. Nous avons testé les effets d'un cocktail de cytokines pro-inflammatoires composé des cytokines recombinante humaine TNF-α (PeproTech, catalog #300-01A), IL1-β (PeproTech, catalog #200-01B) et IL-6 (PeproTech, catalog #200-06) à 50 ng/mL (*d'Aldebert et al., 2020*). Cette concentration a été définie lors de tests préliminaires (données non présentées). Le DON (Sigma Aldrich, D0156) a été utilisé à 100 µM. Cette concentration de DON est élevée par rapport à la littérature, puisqu'il est généralement utilisé à environ 10 µM (*Pinton and Oswald, 2014*). Cependant nous n'avons observé aucune cytotoxicité à 100 µM sur les cellules d'organoïdes d'intestin de porcelet. De plus, nous n'avons pas observé d'effet du DON sur la TEER à des concentrations inférieures (1, 5, 10 et 50 µM) (données non présentées). Nous avons également testé, sans succès, d'autres méthodes pour tenter d'induire une dysfonction de la barrière en traitant les monocouches de cellules par la bactérie inactivée *E. coli* (Heat killed *Escherichia Coli* O111:B4, Invivogen) ou *Salmonella typhimurium* (Heat Killed *Salmonella typhimurium*, Invivogen) à 10^8 cellules/mL ou avec du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 100, 400, 800 et 1000 µM dans de l'intestiCult™ OGM supplémenté avec 20 % de SVF pendant 24 heures.

Le but des **expériences 4 et 5** était de tester les effets des produits dérivés de micro-organismes dans des conditions de challenge induites par les cytokines pro-inflammatoires ou par le DON, respectivement. Les tapis cellulaires ont été traités au pôle apical pendant 24 heures avec du PBS (témoin négatif), du butyrate (1 mM), du YANG (100 µg/mL) ou *L. helveticus* (10^8 cellules/mL). Le traitement a ensuite été renouvelé au pôle apical en présence de (i) PBS (témoin négatif) ou (ii) de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL1-β, IL-6 : 50 ng/mL) (***expérience 4***) ou (iii) de DON (100 µM) (***expérience 5***).

Mesure de la résistance électrique transépithéliale des monocouches de cellules dérivées d'organoïdes de jéjunum

Pour évaluer l'intégrité de la barrière et vérifier la formation de monocouches confluentes, des mesures de résistance électrique transépithéliale (TEER) ont été effectuées toutes les 24 heures pour chaque expérience. Pour cela, un volt-ohmmètre EVOM3 (World precision instrument) équipé d'une électrode (STX2-PLUS) a été utilisé. La TEER d'un insert transwell sans cellule a été soustraite aux valeurs de TEER brutes et les valeurs ont été exprimées en Ohm.cm² (*Srinivasan et al., 2015*). Toutes les mesures ont été effectuées sur une plaque chauffante à 37 °C. Pour les représentations graphiques, les résultats ont été exprimés relativement à la condition témoin du même porcelet.

Analyse de l'expression des gènes dans les monocouches de cellules dérivées d'organoïdes de jéjunum

L'expression des gènes a été analysée dans les monocouches des cellules épithéliales. Les milieux de culture aux pôles apical et basal ont été retirés puis 300 µL de TRI Reagent a été ajouté dans l'insert de culture. Les tapis ont été décrochés à l'aide d'une pipette P1000 par grattage et par pipetage afin d'extraire l'ARN. Les duplicats ont été regroupés, le cas échéant. Le TRI Reagent a ensuite été transféré et placé dans la carboglace et stocké à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ARN total. Les ARN ont été purifiés et dosés comme décrit précédemment (*Mussard et al., 2022*). L'ADNc a été préparé à partir de 300 ng d'ARN comme décrit précédemment (*Mussard et al., 2022*). Après la rétrotranscription, les ADNc ont été dilués au 1:5 (v/v) dans de l'eau exempte de DNAse/RNAse et stockés à -20 °C. L'expression de gènes a été mesurée par qPCR en temps réel à l'aide du système PCR en temps réel QuantStudio six Flex (Thermofisher) et du système microfluidique Biomark utilisant 96.96 Dynamic Arrays IFC (Fluidigm) conformément aux recommandations des fabricants. Les données ont été normalisées par rapport aux gènes de référence (ΔCT), exprimés de manière stable entre les groupes comparés au sein de chaque expérience. Les gènes de référence utilisés sont : (i) *HPRT1* pour l'expérience 1 ; (ii) *B2M* pour la comparaison des expériences 1 et 2 ; (iii) la moyenne géométrique des CT des gènes de référence *B2M* et *RPL32* pour les expériences 2, 3, 4 et 5. Pour les représentations graphiques, les expressions relatives ont ensuite été analysées par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ avec comme condition témoin l'échantillon du groupe PBS du même porc. Pour la comparaison des expériences 1 et 2 les données ont été représentées en $2^{-\Delta Ct}$ et normalisées par rapport à la moyenne des données de l'expérience 1.

Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées sur les données $2^{-\Delta Ct}$ (non normalisées par rapport au témoin du même porcelet) à l'aide du logiciel R (version 4.1.1) avec des modèles linéaires mixtes (packages R « lme4 », « car » et « emmeans »). Le porcelet à l'origine des cellules d'organoïdes a été pris en compte comme effet aléatoire. Les effets fixes étaient : le traitement (PBS, Butyrate, YANG, *L. helveticus*) pour les ***expériences 1, 2, 4 et 5*** ou le challenge (cocktail de cytokines, DON) pour l'***expérience 3*** ou la condition de culture (PBS, IntestiCult™ OGM + 20 % SVF) pour la comparaison des **expériences 1 et 2**. Chaque groupe a été comparé uniquement à la condition contrôle : (i) PBS pour les ***expériences 1, 2 et 3*** ; (ii) cytokines seules pour l'***expérience 4*** et ; (iii) DON seul pour l'***expérience 5***. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque la valeur p était ≤ 0,05.

Résultats et Discussion

1. Effets de produits issus de micro-organismes sur les monocouches de cellules d'organoïdes de jéjunum de porcelets

1.1. Effets des produits issus de micro-organismes dans un milieu de culture mimant la niche des cellules souches

Dans un premier temps, nous avons testé les effets du butyrate, du YANG et de *L. helveticus* sur des monocouches de cellules d'organoïdes de jéjunum **dans un milieu de culture mimant la niche des cellules souches** (***Expérience 1***). Les observations microscopiques ont montré que les tapis cellulaires étaient confluents quels que soient les traitements (***Figure 2A***). Des petites structures rondes et des

amas noirs ont été observés sur les tapis cellulaires traités par le YANG, correspondant probablement aux différentes formes de levures inactivées ou d'agrégats de levures contenus dans ce produit. Cette observation suggère que l'exposition des cellules au YANG n'est pas uniforme à l'échelle du tapis. Les cellules ont formé des épithéliums jointifs caractérisés par une TEER élevée dans toutes les conditions (> 500 Ohm.cm^2). L'ensemble de ces données suggèrent qu'il n'y avait pas de toxicité des produits dérivés de micro-organismes (butyrate, YANG, *L. helveticus*) aux concentrations testées. L'expression de 84 gènes a ensuite été analysée dans les tapis cellulaires. Les résultats obtenus ont permis de sélectionner les gènes analysés pour les expériences suivantes.

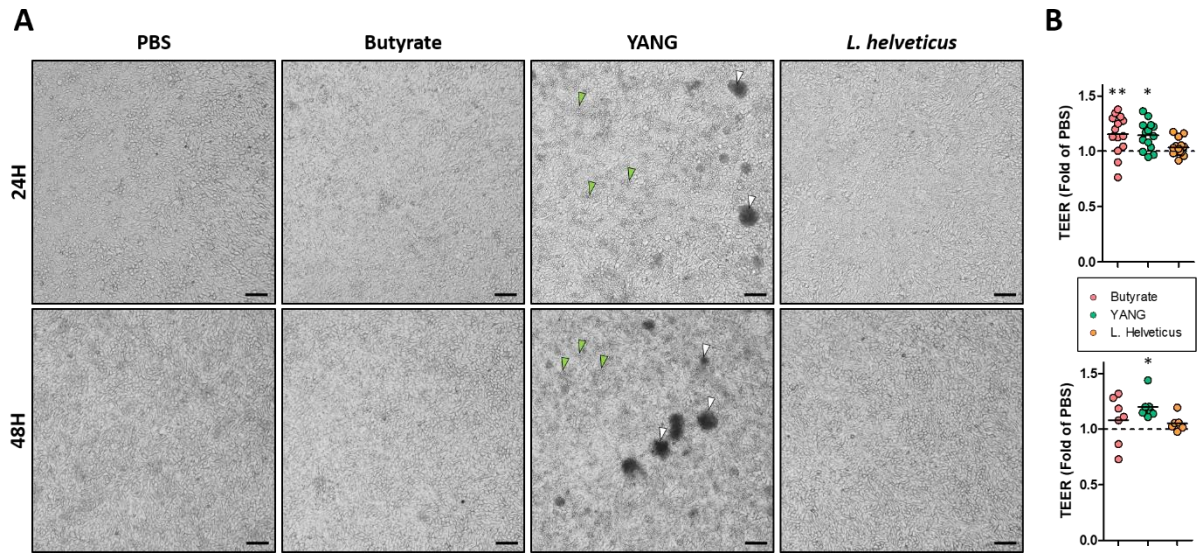


FIGURE 2 : MORPHOLOGIE ET TEER DES TAPIS CELLULAIRES DERIVES D'ORGANOÏDES DE JEJUNUM TRAITES AVEC DU BUTYRATE, DU YANG ET *L. HELVETICUS* DANS UN MILIEU MIMANT LA NICHE DES CELLULES SOUCHES (*EXPERIENCE 1*).

(A) Images représentative des tapis cellulaires. Les monocouches de cellules d'organoïdes ont été observées par microscopie optique 24 h et 48 h après traitement. Les amas noirs (flèches blanches) et les petites structures rondes (flèches vertes) observées sur les tapis traités par le YANG correspondent probablement à différentes fractions de levures inactivées contenues dans le produit. La barre d'échelle représente 100 µm. **(B)** Résistances électriques transépithéliales (TEER) mesurées après 24 et 48h. Les graphiques représentent la TEER exprimée relativement à la valeur mesurée pour les cellules du même porcelet et traitées par le PBS (représenté par la ligne pointillée). Chaque point représente la TEER d'un insert de culture.

1.1.1. Effets du butyrate dans un milieu de culture mimant la niche des cellules souches

Le butyrate a augmenté la TEER après 24 heures de traitement mais pas après 48 heures (***Figure 2B***). L'augmentation de la TEER après traitement avec du butyrate est classiquement observée sur des monocouches de cellules dérivées d'organoïdes d'intestin humain ou sur des lignées cellulaires (*Peng et al., 2007; Yan and Ajuwon, 2017; Vancamelbeke et al., 2019; Pearce et al., 2020*). Dans notre étude, ce résultat était associé à une augmentation de l'expression du gène codant pour la protéine de jonction serrée claudine 2 (*CLDN2)* après 48 heures de traitement (***Figure 3***). Ce résultat semble en contradiction avec l'augmentation de la TEER puisque cette protéine forme des pores permettant le passage d'électrolytes, augmentant ainsi la perméabilité paracellulaire (*Vancamelbeke et al., 2019*). Cependant, le niveau d'expression génique ne reflète pas forcément le niveau d'expression protéique.

D'autres études sur la lignée cellulaire HT-29 ou sur des cellules d'organoïdes de colon humain ont au contraire montré une diminution de l'expression du gène *CLDN2* en présence de concentrations plus élevées de butyrate (5 - 8 mM) (*Daly and Shirazi-Beechey, 2006; Vancamelbeke et al., 2019*). Dans notre expérience, le butyrate n'a pas eu d'effet sur l'expression d'autres gènes codant pour des protéines de jonctions serrées, contrairement à d'autres études montrant par exemple une augmentation de l'expression du gène *OCLN* codant pour la protéine de jonction serrée occludine dans des monocouches de cellules dérivées d'organoïdes de colon humain traitées avec du butyrate à 8 mM (*Vancamelbeke et al., 2019*).

Le butyrate a diminué l'expression du gène *TFF3* codant pour une protéine du mucus, ce qui suggère une diminution de l'activité des cellules en gobelet (***Figure 3***). Cependant, aucun effet du butyrate n'a été observé sur les autres gènes marqueurs des cellules en gobelet *MUC2*, *REG4* et *SPDEF* ou codant pour les mucines transmembranaires *MUC1* et *MUC13*. Ces résultats ne sont pas en accord avec une étude sur la lignée cellulaire HT-29 montrant une augmentation de l'expression des gènes de mucines en présence de butyrate (*Gaudier et al., 2004*). Néanmoins, cette étude a également montré que la composition du milieu de culture influençait fortement cet effet du butyrate sur la production de mucus, ce qui pourrait expliquer la différence avec nos résultats.

Le butyrate a diminué l'expression des gènes *DUOX2* et *PTGS2*, codant pour des enzymes impliquées dans la balance d'oxydoréduction (***Figure 3***). Ces résultats sont cohérents avec des études antérieures montrant que la réduction de l'expression de *DUOX2* et *PTGS2* induite par le butyrate permet de protéger la barrière épithéliale (*Tong et al., 2004; Daly and Shirazi-Beechey, 2006; Hazime et al., 2022*). Le butyrate a également réduit l'expression du gène *PIGR*, codant pour une protéine impliquée dans la transcytose épithéliale des immunoglobulines (***Figure 3***). Le résultat inverse a été observé sur des cellules HT-29 (*Kvale and Brandtzaeg, 1995*).

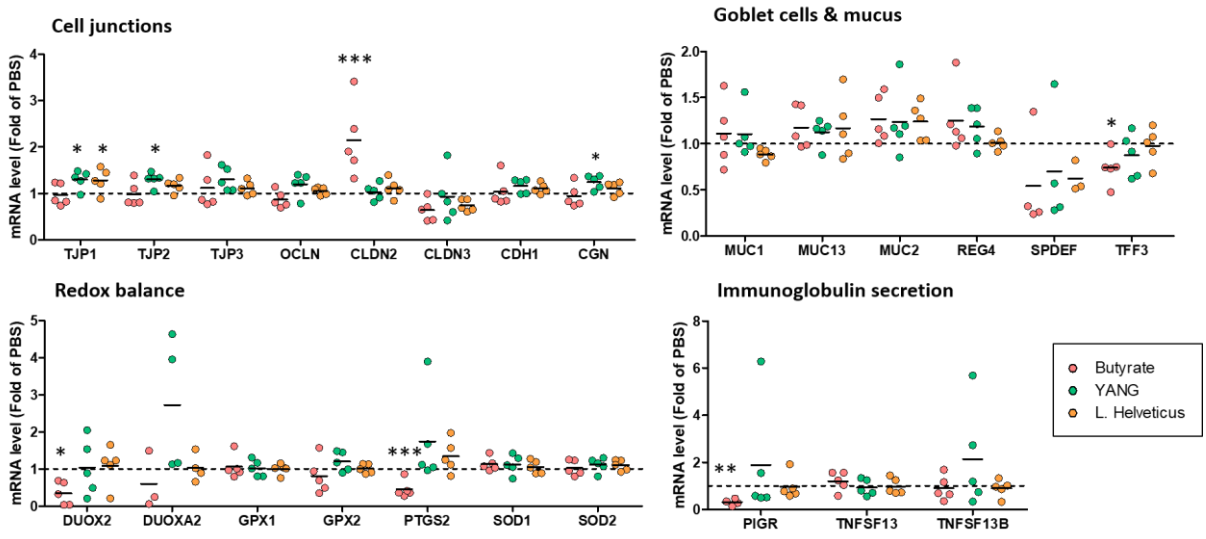


FIGURE 3 : EXPRESSION DE GENES IMPLIQUES DANS LA FONCTION DE BARRIERE DE L'EPITHELIUM DANS DES CELLULES CULTIVEES EN MONOCOUCHES ISSUES D'ORGANOÏDES DE JEJUNUM TRAITEES AVEC DU BUTYRATE, DU YANG OU *L. HELVETICUS* DANS UN MILIEU MIMANT LA NICHE DES CELLULES SOUCHES (*EXPERIENCE 1*).

Les graphiques représentent l'abondance des ARNm exprimés relativement à la valeur mesurée dans les cellules du même porcelet et traitées par le PBS (représenté par la ligne pointillée). Chaque point représente le niveau d'expression dans les cellules d'organoïdes d'un porcelet. Certains échantillons n'avaient pas une concentration suffisante d'ARN pour l'analyse d'expression de gène, l'effectif est donc réduit à n = 5 par condition. *, **, *** : indique une différence significative par rapport au traitement avec du PBS à une valeur de $p < 0,05$ ou 0,01 ou 0,001.

Par ailleurs, le butyrate a augmenté l'expression du gène *CXCL8*, codant pour une cytokine pro-inflammatoire (***Figure 4***). Ce résultat est cohérent avec des études antérieures montrant que le butyrate augmente l'expression de ce gène dans la lignée cellulaire Caco-2 et sur des cellules d'organoïdes de côlon humain (*Fusunyan et al., 1998; Vancamelbeke et al., 2019*). Nous avons observé que le butyrate diminue l'expression du gène *LYZ*, codant pour un peptide antimicrobien (***Figure 4***). Les données de la littérature obtenues sur des monocouches de cellules dérivées d'organoïdes humains ont décrit des effets opposés du butyrate sur l'expression de ce gène avec une étude montrant une diminution de l'expression de *LYZ* (*Grouls et al., 2022*) et une autre montrant une augmentation (*Pearce et al., 2020*). Cette différence de résultats entre ces deux études pourrait être expliquée par la méthode d'obtention des organoïdes : soit dérivée d'une lignée cellulaire d'iPSC humaines, soit issu des cellules souches adulte d'intestin grêle. Dans notre étude, le butyrate a fortement induit l'expression du gène *SLPI* (***Figure 4***) codant pour un inhibiteur de protéases protégeant la fonction de barrière de l'épithélium intestinal (*Ozaka et al., 2021*). Cet effet important ne semble pas avoir été décrit dans d'autres études.

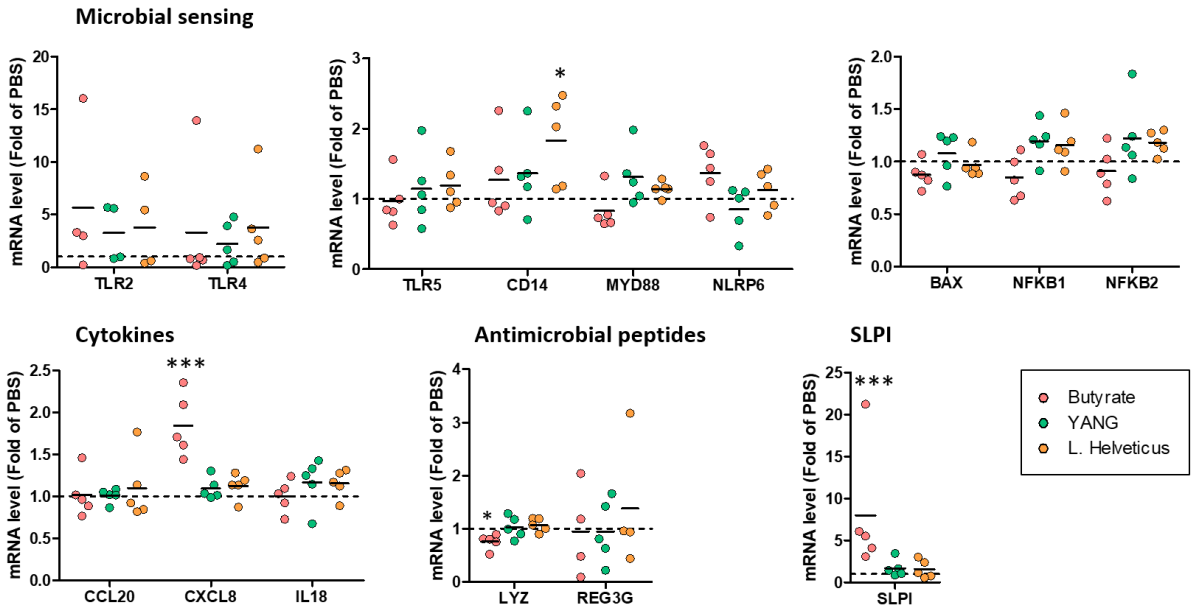


FIGURE 4 : EXPRESSION DE GENES IMPLIQUES DANS LA REPONSE EPITHELIALE AUX MICRO-ORGANISMES DANS DES MONOCOUCHES DE CELLULES DERIVEES D'ORGANOÏDES DE JEJUNUM TRAITEES AVEC DU BUTYRATE, DU YANG OU *L. HELVETICUS* DANS UN MILIEU MIMANT LA NICHE DES CELLULES SOUCHES (*EXPERIENCE 1*).

Les graphiques représentent l'abondance des ARNm exprimés relativement à la valeur mesurée dans les cellules du même porcelet traitées par le PBS (représenté par la ligne pointillée). Chaque point représente le niveau d'expression dans les cellules d'organoïdes d'un porcelet. Certains échantillons n'avaient pas une concentration suffisante d'ARN pour l'analyse d'expression de gène, l'effectif est donc réduit à n = 5 par condition. *, **, *** : indique une différence significative par rapport au groupe PBS à une valeur de $p < 0,05$ ou 0,01 ou 0,001.

Le butyrate a diminué l'expression des gènes *PCNA* et *MKI67*, impliqués dans la prolifération des cellules (***Figure 5A***). Ces résultats sont en accord avec d'autres études sur des cellules souches ou cancéreuses, bien que des résultats inverses aient été obtenus sur des cellules différenciées de l'épithélium intestinal (*Salvi and Cowles, 2021*). De plus, le butyrate a réduit l'expression du gène *HES1*, marqueur d'activation de la voie Notch, impliquée dans la prolifération des cellules

souches/progénitrices intestinales et dans l'inhibition de la différenciation des cellules en cellules sécrétrices (*Ueo et al., 2012*) (***Figure 5A***). Ce résultat soutient l'hypothèse de la diminution de la prolifération des cellules en présence de butyrate et suggère une différenciation des cellules absorbantes plus importante. En effet, le butyrate a augmenté l'expression de gènes marqueurs des cellules absorbantes *ALPI*, *AQP8*, *CA2* ; du gène *SI* codant une glycosidase et des gènes *FABP1* et *SCL6A19* codant pour des transporteurs de lipides et d'acides aminés (***Figure 5B***). Des résultats similaires ont été obtenus pour les gènes *ALPI* et *AQP8* dans d'autres études chez l'homme et la souris (*Alex et al., 2013; Pearce et al., 2020*). Un résultat étonnant de notre étude est la diminution de l'expression de l'enzyme digestive *DPP4* en présence de butyrate, ce qui n'est pas cohérent avec l'augmentation globale des gènes marqueurs de cellules absorbantes (***Figure 5B***).

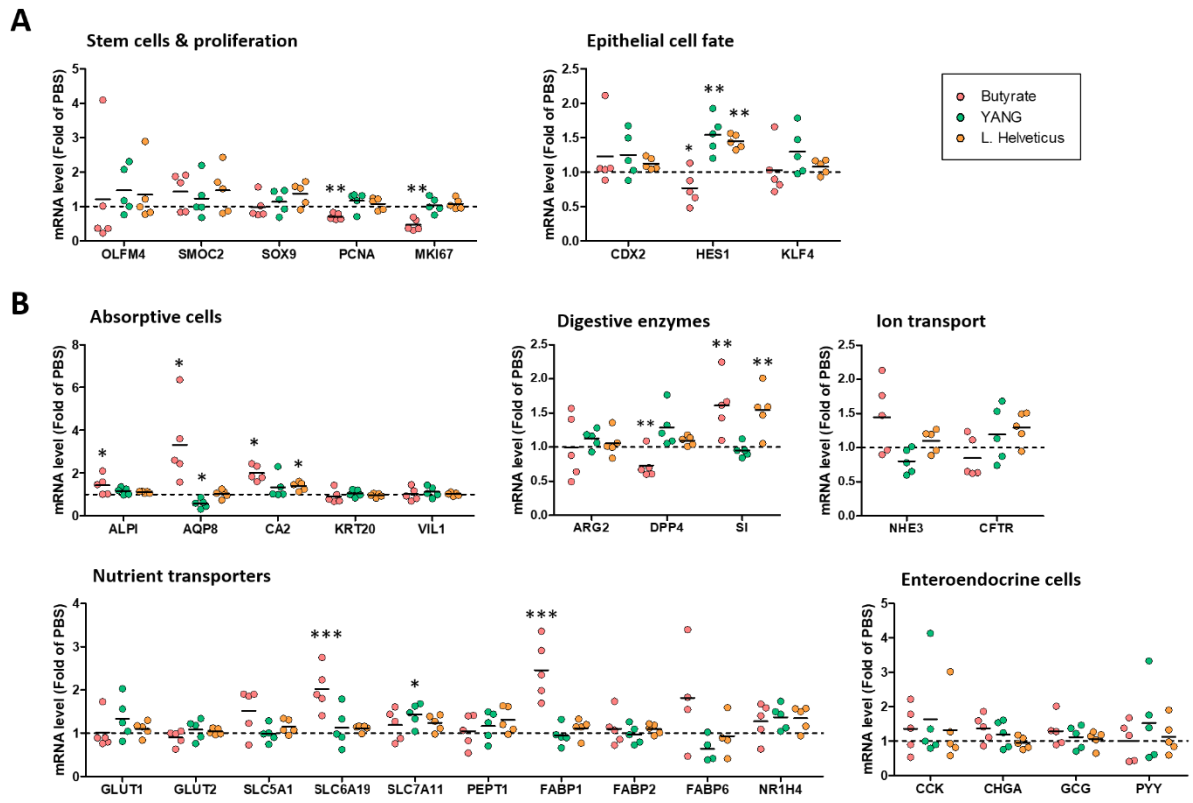


FIGURE 5 : EXPRESSION DE GENES IMPLIQUES DANS LE RENOUVELLEMENT ET LA FONCTION DE NUTRITION DE L'EPITHELIUM DANS DES MONOCOUCHES DE CELLULES ISSUES D'ORGANOÏDES DE JEJUNUM DE PORC TRAITEES AVEC DU BUTYRATE, DU YANG OU *L. HELVETICUS* DANS UN MILIEU MIMANT LA NICHE DES CELLULES SOUCHES (*EXPERIENCE 1*).

Les gènes analysés sont impliqués dans le renouvellement de l'épithélium **(A)** et dans la fonction de nutrition. **(B)** Les graphiques représentent l'abondance des ARNm exprimés relativement à la valeur mesurée dans les cellules du même porcelet traitées par le PBS (représenté par la ligne pointillée). Chaque point représente le niveau d'expression dans les cellules d'organoïdes d'un porcelet. Certains échantillons n'avaient pas une concentration suffisante d'ARN pour l'analyse d'expression de gène, l'effectif est donc réduit à n = 5 par condition. *, **, *** : indique une différence significative par rapport au groupe PBS à une valeur de $p < 0,05$ ou 0,01 ou 0,001.

Par ailleurs, le butyrate n'a pas eu d'effet sur l'expression des gènes marqueurs des cellules entéroendocrines (***Figure 5B***) renforçant l'hypothèse d'une différenciation des cellules en entérocytes en présence de butyrate plutôt qu'en cellules sécrétrices. A l'inverse, une étude sur des cellules

d'organoïdes humains de côlon a montré une augmentation de l'expression des gènes *GHGA* et *PYY* (*Pearce et al., 2020*), en accord avec des données obtenues sur des lignées de cellules entéroendocrines (*Larraufie et al., 2018*).

L'ensemble de nos résultats obtenus dans un milieu de culture mimant la niche des cellules souches suggère que le butyrate renforcerait la fonction de barrière de l'épithélium intestinal, modulerait des mécanismes de défenses innés et réduirait la prolifération des cellules en faveur de la différenciation en entérocytes. Globalement, ces conclusions sont cohérentes avec les effets décrits du butyrate dans d'autres modèles ce qui suggère que l'utilisation des monocouches de cellules d'organoïdes de porcelet est pertinente pour étudier les effets de composés dérivés de micro-organismes sur l'épithélium. Cependant, d'autres résultats semblent être en contradiction avec la littérature. De nombreux facteurs pourraient l'expliquer : l'espèce (porc vs humain), la diversité des cellules dans les organoïdes par rapport aux lignées cellulaires ou encore le niveau de prolifération/différenciation dans chaque étude.

1.1.2. Effets du YANG dans un milieu de culture mimant la niche des cellules souches

Le YANG a augmenté la TEER après 24 heures et 48 heures de traitement (***Figure 2B***), suggérant un renforcement de la fonction de barrière. Ce résultat était associé à une augmentation de l'expression des gènes de protéines de jonctions serrées *TJP1*, *TJP2* et *CGN* après 48 heures de traitement (***Figure 3***). Nos données sont en accord avec des études montrant que la levure probiotique vivante *S. boulardii* ou son surnageant renforcent la fonction de barrière de l'épithélium dans des modèles de lignée cellulaire T84 et d'explant d'intestin humain (*Czerucka et al., 2000; Terciolo et al., 2017*). Une autre étude sur des cellules IPEC-J2 a cependant montré que la levure *S. cerevisiae* (entrant dans la composition du YANG) n'avait pas d'effet sur l'expression du gène *TJP1* en l'absence de challenge (*Liu et al., 2019*).

Dans notre étude, le YANG n'a induit aucun effet sur l'expression des gènes liés à la réponse aux micro-organismes (***Figure 4***). Pourtant, une étude sur des porcelets nourris avec un aliment supplémenté avec le YANG a montré une diminution de l'expression des gènes *IL-6* et *TLR2* dans la muqueuse du jéjunum (*Upadhaya et al., 2019*). Les résultats de cette étude *in vivo* pourraient être liés à un effet du YANG sur les cellules immunitaires de la *lamina propria* qui ne sont pas présentes dans les organoïdes.

Le YANG a augmenté l'expression du gène *HES1* (marqueur d'activation de la voie Notch) et a diminué l'expression du gène *AQP8* (marqueur des entérocytes) pouvant suggérer une réduction de la différenciation (***Figure 5A et B***). Le YANG a augmenté l'expression du gène *SCL7A11*, codant pour un transporteur d'acides aminés (***Figure 5B***). Cette augmentation pourrait être due à la présence d'acides aminées dans le cytoplasme des levures entrant dans la composition du YANG.

Nos résultats obtenus dans un milieu de culture mimant la niche des cellules souches suggèrent donc que le YANG pourrait renforcer la fonction de barrière de l'épithélium. Cependant, ces effets sont modestes car seul la TEER et l'expression de 6 gènes sur les 84 testés a été modifié.

1.1.3. Effets de *L. helveticus* dans un milieu de culture mimant la niche des cellules souches

L. helveticus n'a pas eu d'effet sur la TEER (***Figure 2B***). Pourtant, une augmentation de l'expression du gène *TJP1* a été observée après 48 heures de traitement avec *L. helveticus* (***Figure 3***). Ce résultat

pourrait être en lien avec les effets protecteurs de la même souche vivante (*L. helveticus* R0052) décrits précédemment dans le contexte d'une dysfonction de la barrière induite par des pathogènes sur la lignée cellulaire T84 (*Sherman et al., 2005*). *L. helveticus* a également augmenté l'expression du gène *CD14*, codant pour un co-récepteur du TLR4, impliqué dans la reconnaissance des lipopolysaccharides (LPS) bactériens (***Figure 4***). La bactérie *L. helveticus* est une bactérie Gram+ ne possédant pas de LPS, ce qui suggère l'implication d'autres mécanismes menant à l'augmentation de l'expression de *CD14*. Cependant, aucun autre effet n'a été observé sur les autres gènes impliqués dans les défenses immunitaires innées (***Figure 4***). Une augmentation de l'expression du gène *HES1* (marqueur d'activation de la voie Notch), et des gènes *CA2* et *SI* (marqueurs des cellules absorbantes) suggère une différenciation des cellules épithéliales vers la lignée absorbante en présence de *L. helveticus* (***Figure 5 A et B***).

Ces résultats obtenus dans un milieu de culture mimant la niche des cellules souches montrent donc que *L. Helveticus* régule l'expression de quelques gènes impliqués dans des fonctions importantes de l'épithélium mais les conséquences fonctionnelles restent à confirmer.

1.2. Effets des produits issus de micro-organismes sans facteurs souches au pôle apical

Nous avons supposé que les effets des produits microbiens testés pourraient être différents dans des conditions de culture permettant de favoriser la différenciation des cellules. Nous avons donc testé le butyrate, le YANG ou *L. helveticus* en **retirant les facteurs souches du pôle apical des cellules, de manière à favoriser la différenciation des cellules (*Expérience 2*).** Pour cela, le milieu apical a été remplacé par du PBS (ne contenant pas de facteurs de la niche des cellules souches) dans le but d'induire la différenciation des cellules. Les observations microscopiques et les mesures de TEER ont montré que les tapis cellulaires étaient confluents et formaient une barrière dans toutes les conditions (***Figure 6A***).

1.2.1. Effets du butyrate sans les facteurs souches au pôle apical

Le butyrate a augmenté la TEER après 24 et 48 heures de traitement (***Figure 6B***). Ces résultats indiquaient un renforcement de la barrière épithéliale comme décrit précédemment dans d'autres modèles de lignées cellulaires et d'organoïdes (*Peng et al., 2007; Vancamelbeke et al., 2019; Pearce et al., 2020; Wang et al., 2020a*). L'augmentation de la TEER était associée à une diminution de l'expression du gène *TJP1*, codant pour une protéine de jonction serrée (***Figure 7***). La diminution de l'expression de ce gène a également été observée dans une autre étude (*Grouls et al., 2022*) et pourrait signifier un niveau d'expression protéique suffisant pour assurer la fonction de barrière.

Le butyrate a diminué l'expression des gènes codant pour la cytokine *CCL20* et pour *MYD88* (impliqué dans la voie de signalisation des TLR) alors qu'il a augmenté l'expression du gène *SLPI* (un inhibiteur de protéase), suggérant une modulation des défenses immunitaires innées de l'épithélium intestinal comme décrit précédemment dans des cellules d'organoïdes de colon humains (*Pearce et al., 2020; Grouls et al., 2022*).

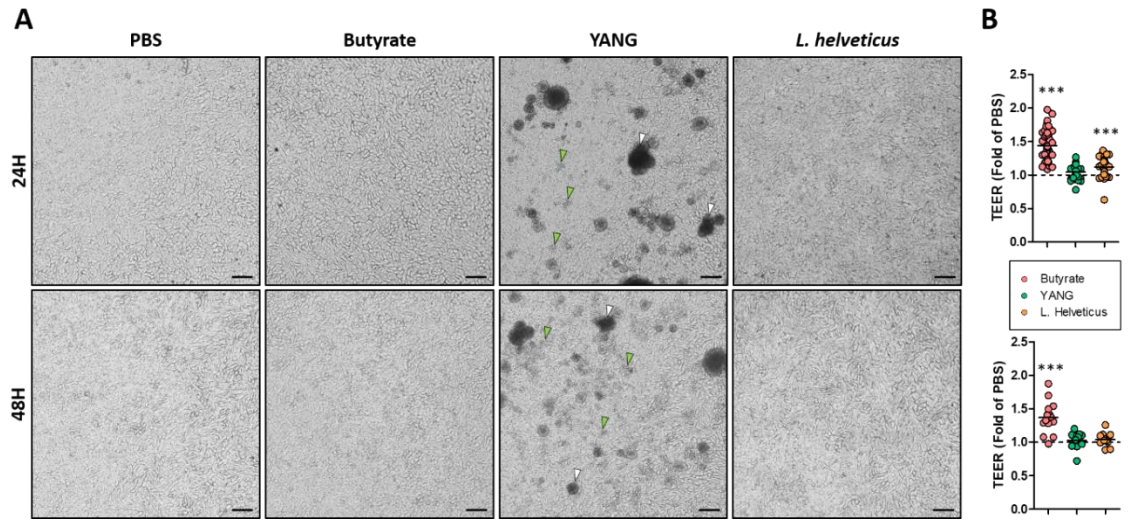


FIGURE 6 : MORPHOLOGIE ET TEER DES TAPIS CELLULAIRES DERIVES D'ORGANOÏDES DE JEJUNUM TRAITES AVEC DU BUTYRATE, DU YANG OU *L. HELVETICUS* SANS FACTEURS SOUCHES AU POLE APICAL (*EXPERIENCE 2*).

(A) Images représentatives des tapis cellulaires. Les monocouches de cellules dérivées d'organoïdes ont été observées par microscopie optique 24 h et 48 h après traitement. Les gros amas noirs (flèches blanches) et les petites structures rondes (flèches vertes) observées sur les tapis traités par le YANG correspondent probablement à différentes fractions de levures contenues dans le produit. La barre d'échelle représente 100 µm. **(B)** Résistances électrique transépithéliale (TEER) mesurée après 24 et 48h. Les graphiques représentent la TEER exprimée relativement à la valeur mesurée des cellules du même porcelet traitées par le PBS (représentée par la ligne pointillée).

L'expression des gènes *MKI67* et *PCNA*, impliqués dans la prolifération cellulaire, ont été nettement augmentés en présence de butyrate (***Figure 7***). Le butyrate a également augmenté l'expression des gènes marqueurs de la différenciation des cellules épithéliales absorbantes (*AQP8*, *CA2* et *SI)* (***Figure 7***). Les effets du butyrate sur la différenciation cellulaire sont connus (*Salvi and Cowles, 2021*), cependant ces résultats restent surprenants car ils sont associés à l'augmentation des gènes marqueurs de la prolifération cellulaire. La présence de différents types cellulaires dans les monocouches de cellules dérivées d'organoïdes pourrait être une explication possible à ces résultats. Le butyrate a augmenté l'expression du gène marqueur des cellules entéroendocrines *GHGA* (***Figure 7***) comme précédemment décrit dans la littérature chez l'homme (*Pearce et al., 2020; Grouls et al., 2022*). En revanche l'expression du gène codant l'entéro-hormone *CKK* a été diminué par le butyrate (***Figure 7***). Cela pourrait s'expliquer par un effet spécifique du butyrate sur certaines sous-population de cellules entéroendocrines exprimant seulement certaines hormones. Le butyrate a réduit l'expression du gène *MUC2* codant pour la principale mucine sécrétée (***Figure 7***) suggérant une diminution de l'ampleur de la sécrétion ou du nombre de cellules en gobelet. Des résultats similaires ont été obtenus dans une autre étude sur des organoïdes dérivés d'iPSC humaines (*Grouls et al., 2022*). Cependant d'autres travaux ont montré des résultats inverses, notamment lorsque le milieu de culture des cellules est dépourvu de glucose, ce qui n'est pas le cas dans nos conditions au niveau du pôle basal (*Gaudier et al., 2004; Pearce et al., 2020*).

Globalement, nos résultats obtenus sur les monocouches de cellules d'organoïdes d'intestin de porcelets cultivées en l'absence de facteurs souches au niveau du pôle apical suggèrent que le butyrate renforcerait la fonction de barrière, modulerait les défenses immunitaires innées et favoriserait le renouvellement de l'épithélium tout en induisant la différenciation des cellules absorbantes et entéroendocrines.

1.2.2. Effets du YANG ou de *L. Helveticus* sans facteurs souches au pôle apical

Le YANG n'a eu aucun effet sur la TEER et l'expression des gènes (***Figure 6 et 7***). *L. helveticus* a augmenté la TEER après 24 heures de traitement (***Figure 6B***). Aucun effet de ce traitement n'a été observé à 48 heures (TEER et expression de gènes), suggérant un effet transitoire de *L. helveticus* lors de la mise en place des tapis cellulaire (***Figure 6B*** et ***Figure 7***). Globalement, très peu d'effets du YANG et de *L. helveticus* ont été observés en sur les monocouches de cellules d'organoïdes cultivées sans facteurs souches au niveau du pôle apical.

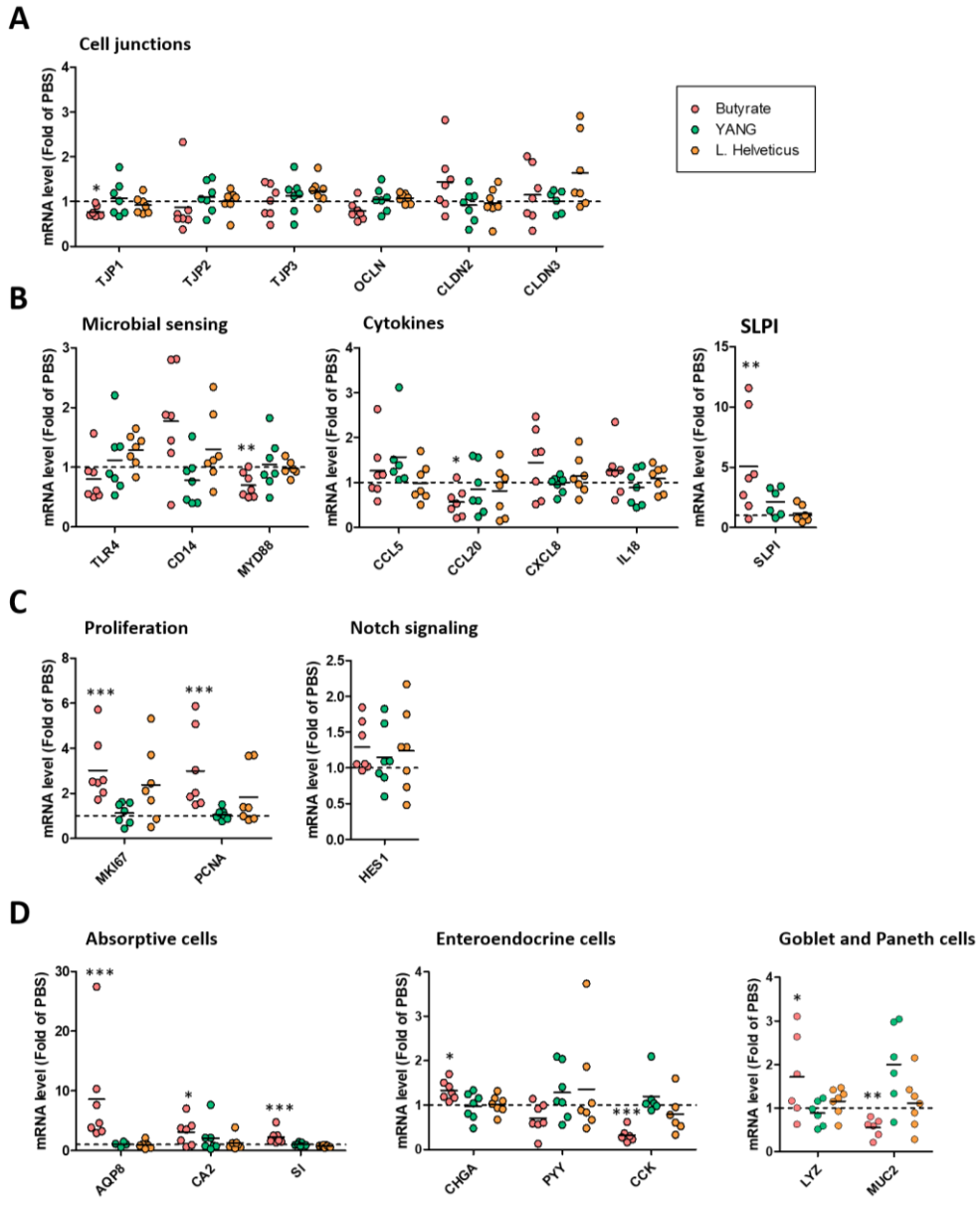


FIGURE 7 : EXPRESSION DE GENES DANS LES MONOCOUCHES DE CELLULES DERIVEES D'ORGANOÏDES DE JEJUNUM DE PORCELETS TRAITEES AVEC DU BUTYRATE, DU YANG OU *L. HELVETICUS* SANS FACTEURS SOUCHES AU POLE APICAL (*EXPERIENCE 2*).

Les gènes analysés sont impliqués dans la fonction de barrière de l'épithélium **(A)**, la réponse aux micro-organismes **(B),** le renouvellement **(C)** et la différenciation de l'épithélium **(D).** Les graphiques représentent l'abondance des ARNm exprimés relativement à la valeur mesurée dans les cellules du même porcelet traitées par le PBS (représenté par la ligne pointillée). Chaque point représente le niveau d'expression dans les cellules d'organoïdes d'un porcelet. *, **, *** : indique une différence significative par rapport au groupe PBS à une valeur de $p < 0,05$ ou 0,01 ou 0,001.

1.3. Comparaison des effets des produits issus de micro-organismes selon les conditions de culture utilisées

Nous avons souhaité comparer les effets des produits testés avec au niveau du pôle apical les facteurs souches favorisant la prolifération (***expérience 1***) ; ou sans ces facteurs souches au niveau du pôle apical (***expérience 2***) (*Figure 8A*). Dans un premier temps, nous avons comparé le phénotype des cellules d'organoïdes d'intestin de porcelet non traitées (témoins) en fonction des conditions de culture utilisées (*Figure 8*).

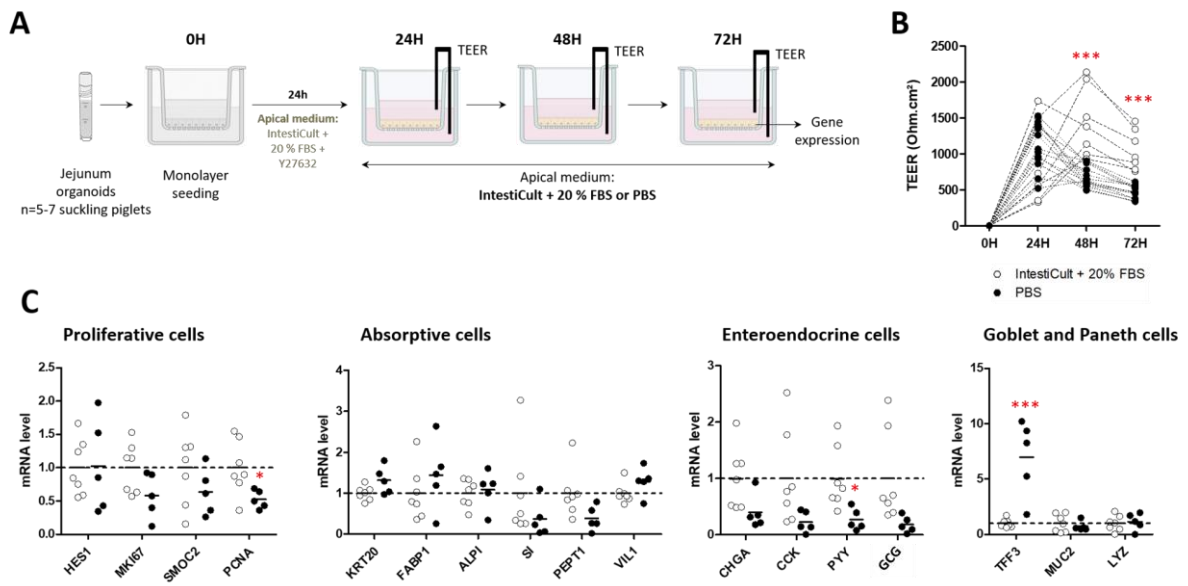


FIGURE 8 : COMPARAISON DU PHENOTYPE DES MONOCOUCHES DE CELLULES D'ORGANOÏDES DE JEJUNUM DE PORCELETS CULTIVEES EN CONDITIONS AVEC (*EXPERIENCE 1*) OU SANS (*EXPERIENCE 2*) LES FACTEURS SOUCHES AU NIVEAU DU POLE APICAL.

(A) Schéma expérimental. Les cellules ont été cultivées au pôle apical soit avec de l'IntestiCult™ OGM + 20% SVF riche en facteurs mimant la niche des cellule souches, soit dans du PBS. **(B)** Résistance électrique transépithéliale (TEER) au cours du temps. Chaque point correspond à un insert. Les différents temps de mesure de chaque insert sont reliés par une ligne pointillée. **(C)** Expression de gènes impliqués dans le renouvellement et la différenciation épithéliale. Les graphiques représentent l'abondance des ARNm exprimés relativement à la valeur moyenne mesurée dans le groupe « IntestiCult™ OGM + 20 % SVF » (représenté par la ligne pointillée). Chaque point représente le niveau d'expression dans les cellules d'organoïdes d'un porcelet. *, **, *** : indique une différence significative entre les deux groupes à une valeur de $p < 0,05$ ou 0,01 ou 0,001. *FBS : fetal bovine serum.*

La TEER étaient moins élevée après 24 et 48 heures lorsque les monocouches étaient cultivées en présence de PBS au pôle apical (*Figure 8B*). De plus, l'expression du gène marqueur de la prolifération *PCNA* était réduit quand les cellules étaient cultivées dans du PBS au pôle apical (*Figure 8C*). Une tendance similaire a été observée pour deux autres gènes marqueurs de la prolifération (*MKI67)* et des cellules souches (*SMOC2)*. Nous n'avons pas observé d'effet des conditions de culture sur l'expression des gènes marqueurs des cellules absorbantes (*Figure 8C*). Les cellules cultivées dans le PBS au pôle apical exprimaient moins le gène codant pour l'entérohormone *PYY* et des tendances similaires ont été observées pour d'autres gènes marqueurs des cellules entéroendocrines (*GCG* et *CCK*) (*Figure 8C*). Au contraire, l'expression du gène *TFF3* (marqueur des cellules productrices de mucus) était nettement plus élevée dans les monocouches cultivées avec du PBS au pôle apical (*Figure*

8C). Globalement, ces résultats suggèrent que l'absence des facteurs mimant la niche des cellules souches au pôle apical modifierait la composition cellulaire des monocouches en réduisant l'abondance des cellules en prolifération et des cellules entéroendocrines et en augmentant l'abondance des cellules sécrétrices de mucus. La diminution de la TEER associée à ce phénotype pourrait peut-être s'expliquer par une perméabilité accrue via les cellules en gobelet qui sont impliquées dans le transport de molécules au travers de l'épithélium par les « goblet cell associated antigen passages » (GAP) (*Knoop and Newberry, 2018*).

Dans un second temps, nous avons comparé les effets des produits dérivés de micro-organismes sur les paramètres mesurés en commun dans les deux conditions de culture (***Tableau 1***). Le butyrate a eu des effets similaires dans les deux conditions de culture sur la TEER à 24h, sur l'augmentation de l'expression du gène *SLPI* et des gènes marqueurs de cellules absorbantes A*QP8, SI, CA2* (***Tableau 1***). Ces effets du butyrate ne semblent donc pas impactés par les conditions de culture et la composition cellulaire des monocouches. Au contraire des effets opposés du butyrate ont été observés pour l'expression des gènes marqueurs de la prolifération (*MKI67* et *PCNA*) en fonction de milieu de culture (***Tableau 1***). Ces résultats pourraient s'expliquer par le « paradoxe du butyrate » qui implique une utilisation différente du butyrate par les cellules épithéliales progénitrices et différenciées (*Kaiko et al., 2016; Salvi and Cowles, 2021*). Les cellules épithéliales non différenciées utilisent le glucose comme source d'énergie ce qui permettrait au butyrate de s'accumuler dans les cellules et d'exercer son action d'inhibiteur des histones désacétylase (HDAC) qui bloquent ainsi l'expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire et donc la prolifération. Au contraire, les cellules différenciées utilisent le butyrate comme source d'énergie et protégeraient ainsi les cellules souches de l'exposition au butyrate. Dans nos conditions de culture sans les facteurs souches au niveau du pôle apical (***expérience 2***), le butyrate est le seul substrat apical disponible pour les cellules. Celui-ci serait donc utilisé par les cellules différenciées comme source d'énergie, ce qui réduirait l'exposition des cellules progénitrices. Au contraire dans l'***expérience 1***, les cellules utiliseraient de préférence le glucose présent dans le milieu de culture IntestiCult™ OGM, permettant au butyrate d'exercer son rôle d'inhibiteur des HDAC, diminuant ainsi l'expression des gènes impliqués dans la prolifération des cellules. Des mécanismes similaires pourraient expliquer les autres effets contradictoires du butyrate en fonction des conditions de culture sur l'expression de gènes impliqués dans les jonctions serrées, les défenses immunitaires innées et les fonctions des cellules sécrétrices (***Tableau 1***).

Le YANG ou *L. helveticus* ont eu plus d'effet dans des conditions de culture mimant l'environnement des cryptes. Les raisons de ces différences ne sont pas connues mais impliquent probablement les modifications de composition cellulaire en fonction du milieu de culture. L'ensemble de ces résultats montre l'importance du choix du milieu de culture en fonction de la question posée. Pour les expériences suivantes, les conditions de culture sans les facteurs souches au niveau du pôle apical ont été utilisées dans le but de favoriser la différenciation des cellules et également pour éviter de possibles interaction des produits dérivés de micro-organisme avec les composés du milieu de culture et notamment le SVF.

TABLEAU 1 : COMPARAISON DES EFFETS DES PRODUITS TESTES SUR LES PARAMETRES MESURES EN COMMUN DANS LES CONDITIONS DE CULTURE AVEC (EXPERIENCE 1) OU SANS (EXPERIENCE 2) LES FACTEURS SOUCHES AU NIVEAU DU POLE APICAL.

Les flèches indiquent les paramètres pour lesquels une augmentation ou une diminution significative est induite par le traitement. Lorsqu'un traitement montre un effet significatif sur un paramètre dans les deux conditions de culture, la couleur indique si les résultats sont similaires (vert) ou opposés (rouge).

Traitement	**Butyrate**		**YANG**		***L. helveticus***	
Milieu de culture	**Exp. 1**	**Exp. 2**	**Exp. 1**	**Exp. 2**	**Exp. 1**	**Exp. 2**
TEER						
24 h	↑	↑	↑			↑
48 h		↑	↑			
Jonctions serrées						
TJP1		↓	↑			
TJP2			↑			
TJP3						
OCLN						
CLDN2	↑					
CLDN3						
Défenses immunitaires innées						
TLR4						
CD14					↑	
MYD88		↓				
CCL5						
CCL20		↓				
CXCL8	↑					
IL18						
SLPI	↑	↑				
Prolifération						
MKI67	↓	↑				
PCNA	↓	↑				
HES1	↓		↑		↑	
Cellules absorbantes						
AQP8	↑	↑				
CA2	↑	↑			↑	
SI	↑	↑			↑	
Cellules sécrétrices						
CHGA		↑				
PYY						
CCK		↓				
LYZ	↓	↑				
MUC2		↓				

Au cours des expériences 1 et 2, nous avons étudié les effets des produits dérivées de micro-organismes seuls. Le deuxième objectif de cette étude était d'étudier les effets de nos trois composés butyrate, YANG ou *L. helveticus* sur des monocouches de cellules d'organoïdes de jéjunum en condition de challenge mimant la dysfonction de la barrière épithéliale observée lors du sevrage des porcelets.

2. Induction d'une dysfonction de la barrière épithéliale dans le modèle de monocouches de cellules d'organoïdes de jéjunum de porcelets

L'objectif de cette étape était d'induire une dysfonction de la barrière épithéliale dans le modèle des monocouches de cellules d'organoïdes de jéjunum de porcelets. Nous avons effectué des tests préliminaires avec différents traitements pour tenter d'induire une altération de la barrière épithéliale. Nous n'avons observé aucun effet du traitement des cellules au pôle apical par des bactéries inactivées par la chaleur (Heat killed *Escherichia Coli* O111:B4, Heat Killed *Salmonella typhimurium*, 10^8 cells/mL, Invivogen) (données non présentées). Ces résultats pourraient s'expliquer par une résistance des cellules dérivées d'organoïdes de jéjunum de porcelets dans nos conditions de culture liée à leur niveau de différenciation ou par une protection des cellules par la sécrétion d'une couche de mucus. Nous avons également testé les effets du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2, différentes concentrations testées) pour mimer le stress oxydant induit par le sevrage chez le porcelets (*Oshima et al., 2007*). Cependant, nous avons observé une destruction partielle des tapis indépendamment de la concentration en H_2O_2 (données non présentées). Nous avons donc évalué les effets de deux autres challenges visant à induire une dysfonction de la fonction de barrière. Après le sevrage des porcelets, la concentration de cytokines pro-inflammatoires est plus élevée dans la muqueuse intestinale (*Pié et al., 2004*) et des études antérieures ont montré que des cocktails de cytokines pro-inflammatoires perturbent la fonction de barrière de l'épithélium intestinal dans différents modèles cellulaires dont celui des monocouches dérivées d'organoïdes intestinaux (iléon et côlon) (*Bruewer et al., 2003; Jelinsky et al., 2023*). D'autre part, une exposition à la mycotoxine DON est possible après le sevrage des porcelets via la consommation de céréales contaminées par des champignons lors du stockage. Les effets délétères du DON sur la barrière intestinale ont été décrit précédemment dans divers modèles (*Pinton and Oswald, 2014*). Nous avons donc testé les effets d'un cocktail de cytokines pro-inflammatoires (composé de TNF-α, IL1-β, IL-6 à 50 ng/mL) ou du DON (100 µM) au pôle apical de monocouches de cellules épithéliales dérivées d'organoïdes de jéjunum de porcelets cultivés en l'absence de facteurs mimant la niche des cellules souches au pôle apical (***Expérience 3***).

2.1. Effets d'un cocktail de cytokines pro-inflammatoires sur les monocouches de cellules d'organoïdes de jéjunum de porcelets

Le traitement des cellules avec le cocktail de cytokines n'a pas eu d'effet sur la morphologie des tapis cellulaires, ni sur la TEER, ni sur l'expression des gènes de jonctions serrées, des marqueurs de la prolifération et des différents types cellulaires (***Figure 9***). A l'inverse, une étude antérieure a montré une diminution de la TEER de monocouches de cellules d'organoïdes de côlon humain après 48 heures de traitement avec un cocktail de cytokines (TNF-α, IFN-γ à 25 ng/mL) appliqué au niveau du compartiment basal des cellules (*Vancamelbeke et al., 2019*). Une autre étude récente a aussi montré que la stimulation (apicale et basale) de monocouches de cellules d'organoïdes de côlon humain par un cocktail de cytokines (TNF- α + IFN-γ + IL-1α à 50 ng/mL) induisait une dysfonction de la barrière épithéliale (*Jelinsky et al., 2023*).

Dans notre étude, seule l'expression du gène *CCL20*, codant pour une cytokine pro-inflammatoire, était augmentée après le traitement des cellules par le cocktail de cytokines (***Figure 9D***). Une autre étude a également montré une augmentation de la sécrétion de la cytokine CCL20 au pôle basal des cellules après une exposition à un cocktail de cytokine (TNF-α, IFN-γ) au pôle basal des cellules pendant 48 heures (*Vancamelbeke et al., 2019*). Nous avons aussi observé une tendance à l'augmentation de gènes liés à l'inflammation lors du traitement par les cytokines (*TRL4, CD14, CXCL8*) mais ces effets n'étaient pas significatifs (***Figure 9D***).

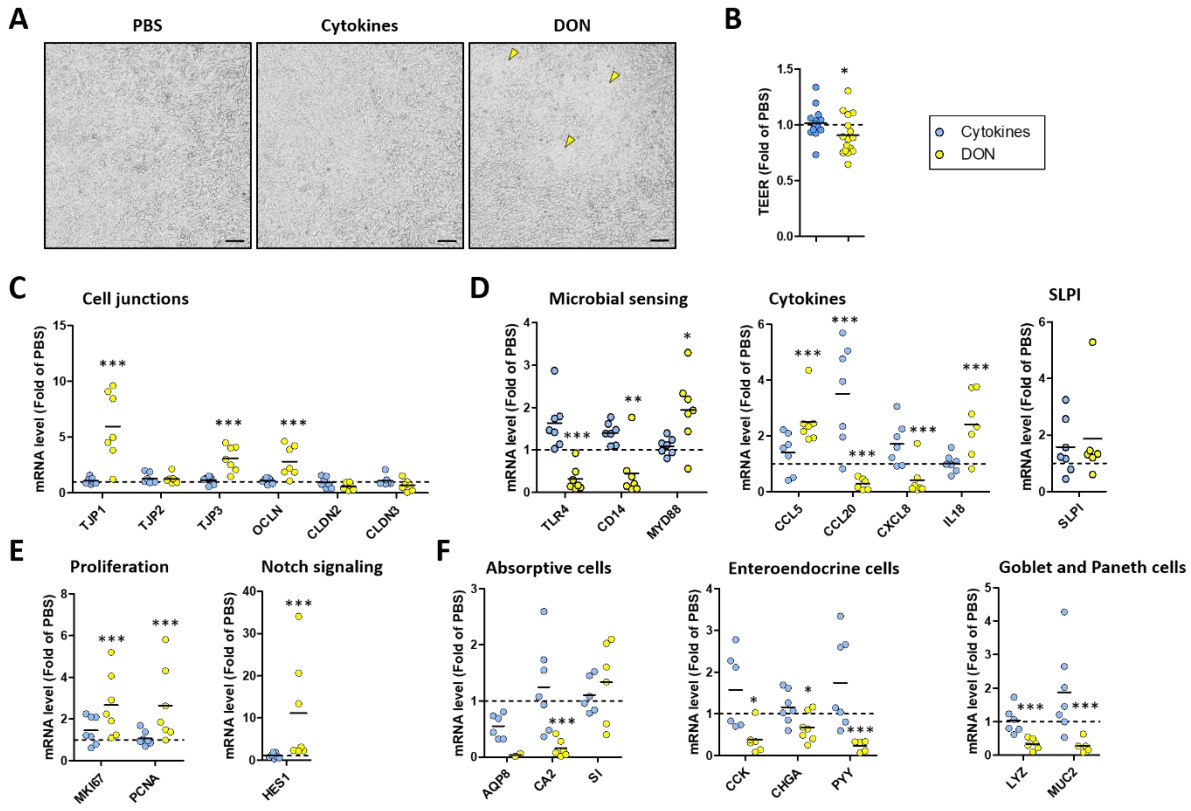


FIGURE 9 : MORPHOLOGIE, TEER ET EXPRESSION DE GENES DES TAPIS CELLULAIRES TRAITES AVEC UN COCKTAIL DE CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES OU DU DON (*EXPERIENCE 3*).

(A) Images représentative des tapis cellulaires. Les monocouches de cellules d'organoïdes ont été observées par microscopie optique 24 h après traitement. Les monocouches de cellules traitées avec du DON avaient des contours cellulaires moins visible par endroit (indiqué par les flèches jaunes). La barre d'échelle représente 100 µm. **(B)** TEER. Le graphique représente la TEER mesurée après 24h de traitement et exprimée relativement à la valeur mesurée des cellules du même porcelet, traitées par du PBS seul (représenté par la ligne pointillée). Expression des gènes impliqués dans la fonction de barrière **(C),** la réponse aux micro-organismes **(D),** le renouvellement **(E)** et la différenciation de l'épithélium **(F).** Les graphiques représentent l'abondance des ARNm exprimés relativement à la valeur mesurée dans les cellules du même porcelet traitées par le PBS (représenté par la ligne pointillée). Chaque point représente le niveau d'expression dans les cellules d'organoïdes d'un porcelet. *, **, *** : indique une différence significative par rapport au groupe PBS à une valeur de $p < 0,05$ ou 0,01 ou 0,001.

Dans notre étude, nous avons exposé les cellules aux cytokines seulement par le pôle apical. Nous avons fait ce choix parce que la sécrétion de cytokines est plus élevée dans le milieu apical que dans le milieu basal de monocouches de cellules d'organoïdes de côlon humains (*Iribarren et al., 2022*). La stimulation par un cocktail de cytokines par le pôle basal, mimant l'inflammation via la *lamina propria*, pourrait être un paramètre important pour l'observation d'effets sur la barrière épithéliale. De plus, le cocktail de cytokines que nous avons choisi sur la base d'une publication antérieure sur des organoïdes 3D de côlon humain pourrait ne pas être adapté à notre modèle (*d'Aldebert et al., 2020*). L'utilisation de cytokines recombinantes humaines sur des cellules intestinales porcines pourrait aussi réduire leurs effets. Globalement, nos résultats montrent que les effets du cocktail de cytokines sur la barrière épithéliale étaient très modérés et probablement peu adaptées dans nos conditions pour mimer l'inflammation induite par le sevrage. Une exposition prolongée au cocktail de cytokines ou l'utilisation d'autres cytokines, d'origine porcine et à des concentrations différentes pourraient permettre d'induire une dysfonction de la barrière épithéliale plus importante.

2.2. Effets du DON sur les monocouches de cellules d'organoïdes de jéjunum de porcelets

Les cellules traitées avec du DON avaient des contours cellulaires moins visible lors de l'observation en microscopie optique (***Figure 9A***), suggérant un effet du DON sur la morphologie des cellules et possiblement une différenciation cellulaire moins importante. Le DON a réduit la TEER (***Figure 9B***), néanmoins, ces effets du DON sur la TEER étaient modérés et relativement variables d'un individu à un autre. Ces effets sont également nettement moins forts que ceux observés sur d'autres modèle cellulaire tel que les lignées cellulaires Caco-2 ou IPEC utilisant une concentration de DON plus faible (5 à 10 fois) (*Goossens et al., 2012; Pinton and Oswald, 2014; Ghareeb et al., 2015*). Il a été montré que les cellules non différenciées et prolifératives sont plus sensibles au DON que les cellules différenciées (*Luo et al., 2021*). Cela pourrait expliquer la résistance de nos cellules cultivées dans des conditions réduisant la prolifération des cellules.

La diminution de la TEER induite par le DON était associée à une forte augmentation de l'expression des gènes *TJP1*, *TJP3* et *OCLN*, codant pour des protéines de jonctions serrées (***Figure 9C***). Une étude récente a également montré une augmentation de l'expression des gènes *TJP1* et *OCLN* dans des cellules IPEC-J2 après une exposition au DON (*Liu et al., 2019*). Ce mécanisme pourrait refléter une compensation au niveau transcriptionnel de l'inhibition de la synthèse protéique induite par le DON qui est une ribotoxine (*Pinton and Oswald, 2014*). Il serait donc intéressant d'étudier dans nos conditions le niveau d'expression des protéines de jonctions serrées. En effet, une étude a montré que le niveau d'expression des protéines de jonctions serrées TJP1, claudine-2 et occludine était réduit dans des organoïdes d'intestin grêle murins exposés au DON à 1 µM de manière basolatérale (*Hanyu et al., 2020*). D'autres études dans des modèles classiques ont également montré une diminution de l'expression protéique des claudines 3 et 4 (*Pinton and Oswald, 2014; Ghareeb et al., 2015*).

Le DON a augmenté l'expression des gènes *MYD88*, *CCL5* et *IL18* (***Figure 9D***). Au contraire, le DON a réduit l'expression des gènes *TLR4*, *CD14*, *CCL20* et *CXCL8* (***Figure 9D***). Ces résultats montrent que le DON module fortement les défenses immunitaires innées des cellules épithéliales, comme décrit dans la littérature sur d'autres modèles (*Pinton and Oswald, 2014; Ghareeb et al., 2015*). Cependant, la plupart des études ont montré une augmentation de l'expression du gène *CXCL8* dans des cellules Caco-2 ou IPEC exposées au DON (*Pinton and Oswald, 2014; Ghareeb et al., 2015*).

Le DON a fortement augmenté l'expression de gènes marqueurs de la prolifération (*PCNA* et *MKI67*) et du gène *HES1*, impliqué dans la voie Notch et favorisant la prolifération cellulaire (***Figure 9E***). Il pourrait s'agir d'une réponse adaptative des cellules pour maintenir l'intégrité du tapis cellulaire en présence de DON. L'effet du DON sur l'augmentation de l'expression du gène *HES1* a récemment été décrite sur des cellules IPEC-J2 (*Xiao et al., 2022*). Cependant, une autre étude a montré une diminution de l'abondance des cellules souches et des cellules en prolifération dans des organoïdes d'intestin grêle murins traités avec du DON (1µM) de manière basolatérale (*Hanyu et al., 2020*), suggérant l'importance du pôle d'exposition des cellules (apical dans notre étude, en accord avec l'exposition physiologique).

Le DON a réduit l'expression des gènes marqueurs de la différenciation des cellules absorbantes (*CA2, AQP8*), des cellules entéroendocrines (*CCK*, *CHGA*, *PYY*), des cellules sécrétrices de peptides antimicrobiens (*LYZ*) et de mucus (*MUC2*) (***Figure 9F***). Le résultat obtenu pour *MUC2* est cohérent avec la littérature décrivant une diminution du nombre de cellules en gobelet et des mucines sécrétées après une exposition au DON sur des explants *in vitro* (*Pinton and Oswald, 2014*).

En résumé, le DON perturbe fortement l'homéostasie épithéliale dans le modèle des monocouches de cellules d'organoïdes de jéjunum de porcelets. Certains de ses effets miment ceux observés lors du sevrage, tels que l'altération de la fonction de barrière, l'augmentation de l'expression de cytokines

pro-inflammatoires, la réduction de la capacité d'absorption et la diminution de la production de mucus.

Comparativement aux données de la bibliographie, les monocouches de cellules dérivées d'organoïdes de jéjunum de porcelets semblent nettement plus résistantes à différents types de challenges par rapport aux lignées cellulaires classiquement utilisées *in vitro*. Cette résistance pourrait s'expliquer par la diversité des types cellulaires présents et par un niveau de différenciation plus important. Enfin, nous avons étudié l'effet des produits issus de micro-organismes dans des conditions de challenge soit avec le cocktail de cytokines pro-inflammatoires soit avec le DON.

3. Effets de produits issus de micro-organismes sur les monocouches de cellules d'organoïdes de jéjunum de porcelets en condition de challenge

3.1. Effets des produits issus de micro-organismes en condition de challenge induit par un cocktail de cytokines pro-inflammatoires

Nous avons dans un premier temps étudié les effets du butyrate, du YANG ou de *L. helveticus* sur des monocouches de cellules d'organoïdes de jéjunum de porcelet exposées au cocktail de **cytokines pro-inflammatoires** (TNF-α, IL1-β, IL-6) en l'absence de facteurs souches au pôle apical des cellules (***Expérience 4***). Des monocouches confluentes et caractérisées par une TEER élevée ont été obtenues dans toutes les conditions (***Figure 10A***).

3.1.1. Effets du butyrate en condition de challenge induit par un cocktail de cytokines pro-inflammatoires

En présence du cocktail de cytokines pro-inflammatoires, le butyrate a augmenté la TEER, l'expression de *SLPI, PNCA, AQP8, CA2, SI, LYZ* et diminué l'expression de *MYD88, CCL20, CCK et MUC2* (***Figure 10C-F***), comme déjà observé en l'absence des cytokines (***expérience 2***). Les cytokines n'ont donc pas bloqué ces effets du butyrate. Cependant, la réduction de l'expression de *TJP1* et l'augmentation de *MKI67* et *CHGA* induite par le butyrate sans challenge n'ont pas été reproduites en présence des cytokines mais des tendances similaires ont été observées (***Figure 10C, E et F***). A l'inverse, le butyrate a réduit l'expression de *OCLN* et de *TLR4* uniquement en présence des cytokines (***Figure 10C et D***), mais ici encore des tendances similaires avaient été observées en l'absence de cytokines.

L'augmentation de l'expression du gène de la cytokine pro-inflammatoire CCL20 induite par le cocktail de cytokines est réduite par le butyrate ce qui particulièrement intéressant puisqu'il s'agit du seul gène régulé par les cytokines dans notre modèle (***Figure 10D***). A l'inverse, une étude sur des cellules de monocouches dérivées d'organoïdes de côlon humain a montré que le butyrate (8 mM) ne prévenait pas les effets d'un cocktail de cytokines (TNF-α et IFN-γ à 25 ng/mL au pôle basal des cellules) sur l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoire (dont CCL20) (*Vancamelbeke et al., 2019*). Dans nos conditions de culture, le butyrate pourrait donc prévenir l'inflammation induite par les cytokines.

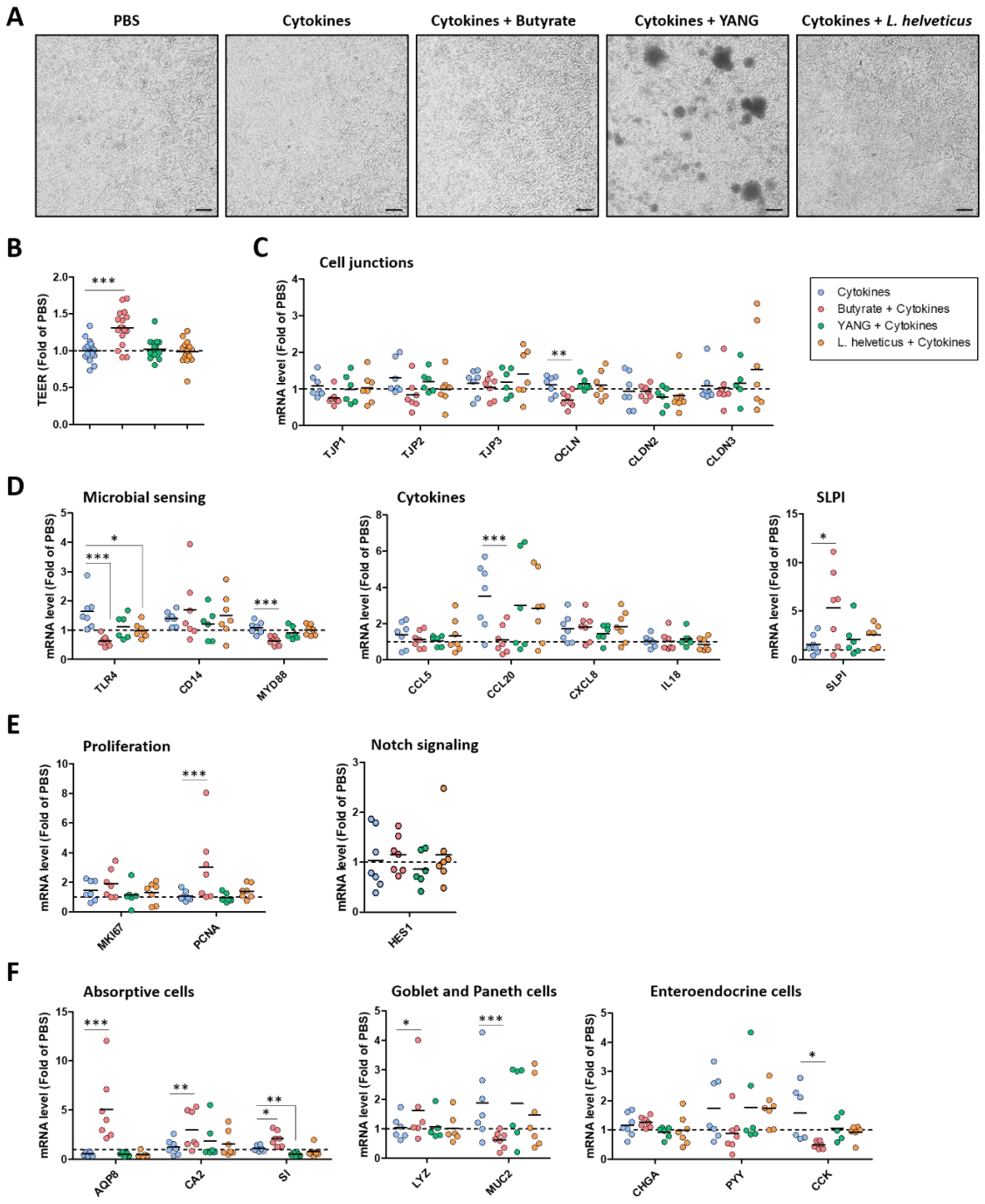


FIGURE 10 : MORPHOLOGIE, TEER ET EXPRESSION DE GENES DES MONOCOUCHES DE CELLULES DERIVEES D'ORGANOÏDES DE JEJUNUM DE PORCELETS TRAITEES AVEC DU BUTYRATE, DU YANG ET *L. HELVETICUS* ET EXPOSEES A UN COCKTAIL DE CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES (*EXPERIENCE 4*).

(A) Images représentative des tapis cellulaires. Les monocouches de cellules d'organoïdes ont été observées par microscopie optique 24 h après traitement par les cytokines. La barre d'échelle représente 100 µm. **(B)** Le graphique représente la TEER mesurée à 24h et exprimée relativement à la valeur mesurée des cellules du même porcelet traitées par du PBS seul (représenté par la ligne pointillée). Expression des gènes impliqués dans la fonction de barrière de l'épithélium **(C),** la réponse épithéliale aux micro-organismes **(D),** le renouvellement **(E)** et la différenciation de l'épithélium **(F).** Les graphiques représentent l'abondance des ARNm exprimés relativement à la valeur mesurée dans les cellules du même porcelet traitées par le PBS (représenté par la ligne pointillée). Chaque point représente le niveau d'expression dans les cellules d'organoïdes d'un porcelet. *, **, *** : indique une différence significative par rapport au groupe cytokines à une valeur de $p < 0,05$ ou 0,01 ou 0,001.

3.1.2. Effets du YANG ou de *L. helveticus* en condition de challenge induit par un cocktail de cytokines pro-inflammatoires

Le YANG n'a pas eu d'effet sur la TEER en présence du cocktail de cytokines pro-inflammatoires (***Figure 10***). Le YANG n'a pas réduit l'expression du gène *CCL20* induite par le cocktail de cytokines (***Figure 10D***). Le YANG a diminué l'expression du gène *SI*, codant pour une enzyme digestive, lorsque les cellules étaient exposées à des cytokines pro-inflammatoires (***Figure 10F***). Cet effet n'a pas été retrouvé en présence de YANG ou de cytokines uniquement suggérant une interaction du YANG et des cytokines sur l'expression de ce gène. Cependant, la régulation d'un seul gène ne permet pas de conclure sur d'éventuels effets du YANG en présence de cytokines.

L. helveticus n'a pas eu d'effet sur la TEER en présence du cocktail de cytokines (***Figure 10***). *L. helveticus* n'a pas prévenu l'augmentation de l'expression du gène *CCL20* induite par les cytokines (***Figure 10D***). *L. helveticus* a réduit l'expression du gène *TLR4*, qui avait tendance à être plus exprimé en présence des cytokines (***Figure 10D***). Ces résultats suggèrent un effet anti-inflammatoire de *L. helveticus* qui devrait être confirmé par d'autres indicateurs.

3.2. Effets des produits issus de micro-organismes en condition de challenge induit par le DON

Dans un second temps nous avons étudié les effets du butyrate, du YANG et de *L. helveticus* sur des monocouches de cellules d'organoïdes de jéjunum de porcelet traitées par la mycotoxine **DON** en l'absence de facteurs souches au pôle apical (***Expérience 5***). Des monocouches de cellules confluentes et caractérisées par une TEER élevée ont été obtenues quel que soit le traitement (***Figure 11A***).

3.2.1. Effets du butyrate en condition de challenge induit par le DON

Le butyrate avait tendance à limiter les effets délétères du DON sur la TEER mais cet effet n'était pas significatif (***Figure 11B***). Cette observation était associée à une atténuation par le butyrate des effets du DON sur l'expression des gènes codant pour deux protéines de jonctions serrées (*CLDN2* et *OCLN*) (***Figure 11C***). En lien avec ces observations, une étude sur des cellules HT-29-MTX (sécrétrices de mucus) a également montré que la dysfonction de la barrière épithéliale induite par le DON (50 µM) était atténuée par le butyrate (5-10 mM) (*Nielsen et al., 2018*).

Par ailleurs, le butyrate a amplifié certains effets du DON sur les défenses innées en réduisant l'expression des gènes *TLR4* et *CCL20* et en augmentant l'expression du gène *IL18* (***Figure 11D***). En revanche, le butyrate s'est opposé à la diminution de l'expression du gène *CXCL8* codant pour une cytokine induite par le DON (***Figure 11D***). De la même manière, une étude sur des cellules IPEC-J2 a montré que le butyrate (0,5 mM) permettait d'atténuer la diminution de l'expression de peptides antimicrobiens induite par le DON (1 µM) (*Wang et al., 2020b*).

L'augmentation de l'expression des gènes marqueurs de prolifération *PCNA* et *MKI67* induite par le DON a été fortement amplifiée par le butyrate (***Figure 11E***). Ce résultat pourrait s'expliquer par un effet protecteur du butyrate permettant de préserver l'intégrité de la monocouche de cellules en présence de DON. Le butyrate a également rétabli le niveau d'expression du gène marqueur des cellules entéroendocrines *CHGA* qui était réduit par le DON (***Figure 11F***). Cet effet du butyrate favorisant la différenciation des cellules entéroendocrines a déjà été décrit dans d'autres études (*Pearce et al., 2020*).

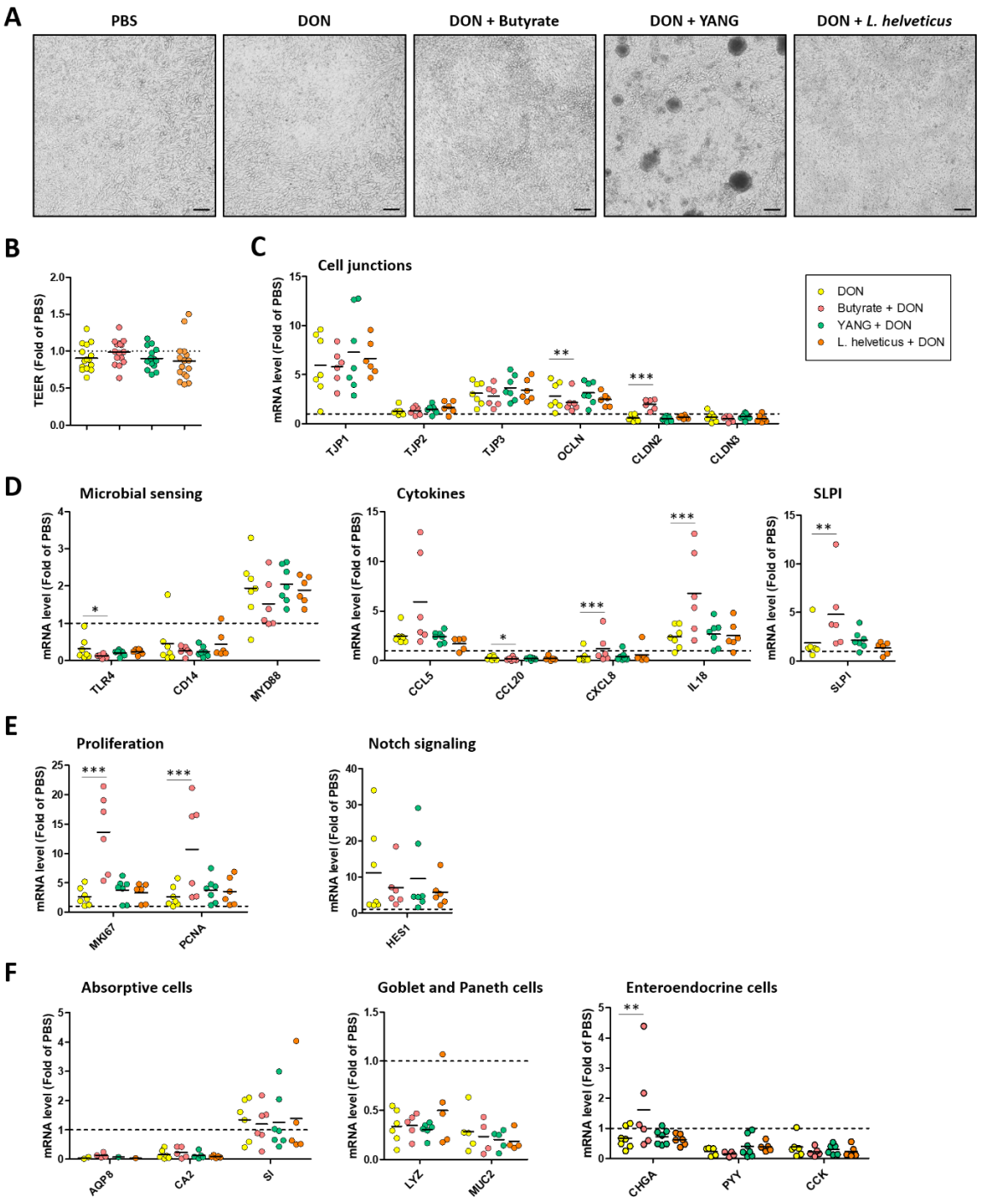


FIGURE 11 : MORPHOLOGIE, TEER ET EXPRESSION DES GENES DES MONOCOUCHES DE CELLULES DERIVEES D'ORGANOÏDES DE JEJUNUM DE PORCELETS TRAITEES AVEC DU BUTYRATE, DU YANG ET *L. HELVETICUS* ET EXPOSEES AU DON (*EXPERIENCE 5*).

(A) Images représentative des tapis cellulaires. Les monocouches de cellules d'organoïdes ont été observées par microscopie optique 24h après traitement par le DON. La barre d'échelle représente 100 µm. **(B)** Le graphique représente la TEER mesurée à 24h et exprimée relativement à la valeur mesurée des cellules du même porcelet traitées par du PBS seul (représenté par la ligne pointillée). Expression des gènes impliqués dans la fonction de barrière de l'épithélium **(C),** la réponse épithéliale aux micro-organismes **(D),** le renouvellement **(E)** et la différenciation de l'épithélium **(F).** Les graphiques représentent l'abondance des ARNm exprimés relativement à la valeur mesurée dans les cellules du même porcelet traitées par le PBS (représenté par la ligne pointillée). Chaque point représente le niveau d'expression dans les cellules d'organoïdes d'un porcelet. *, **, *** : indique une différence significative par rapport au groupe DON à une valeur de $p < 0,05$ ou 0,01 ou 0,001.

L'augmentation de la TEER et de la différenciation des cellules absorbantes induite par le butyrate n'a pas été retrouvée en présence de DON (***Figure 11B et F***). Ces résultats suggèrent que le DON pourrait bloquer certains effets bénéfiques du butyrate. En revanche, le DON n'a pas empêché la forte augmentation de l'expression du gène *SLPI* induite par butyrate (***Figure 11D***).

Les interactions entre le butyrate et le DON sont donc complexes puisque le butyrate préviendrait certains effets du DON mais amplifierait paradoxalement d'autres effets de cette mycotoxine. De même, certains effets du butyrate ont été conservés en présence de DON, tandis que d'autres ne l'étaient pas. Nos données suggèrent que favoriser la production de butyrate par le microbiote des porcelets après le sevrage pourrait limiter certains effets toxiques du DON. En effet, une supplémentation en butyrate chez des porcelets a permis de prévenir les effets délétères du DON sur la croissance et sur la fonction de barrière (*Wang et al., 2020b*). De même, une étude chez la souris a montré que le butyrate pouvait atténuer les effets négatifs du DON sur les cellules productrices de mucus (*Lin et al., 2020*). Au contraire, la présence de DON dans les aliments pourrait peut-être limiter certains effets bénéfiques du butyrate dont la production par le microbiote augmente avec l'ingestion d'aliment solide après le sevrage. De plus, il a été montré que le DON réduit la production de butyrate par le microbiote chez le porc (*Qiu et al., 2021*). Les approches nutritionnelles visant à augmenter la production de butyrate en présence de DON pourraient donc s'avérer inefficaces et une supplémentation de l'aliment avec du butyrate pourrait être préférable. Enfin, les quelques effets synergiques observés entre le butyrate et le DON posent question en raison d'éventuels conséquences indésirables de leur combinaison.

3.2.2. Effets du YANG ou de *L. helveticus* en condition de challenge induit par le DON

Le YANG et *L. helveticus* n'ont limité aucun des effets induit par le DON sur la TEER ou l'expression des gènes étudiés (***Figure 11***). La concentration du DON était possiblement trop élevée pour observer d'éventuels effets protecteurs de ces produits dérivés de micro-organismes sur l'épithélium intestinal. En effet avec une dose d'exposition 10 fois plus faible, d'autres études sur des cellules IPEC-J2 ou sur des explants de jéjunum de porcs ont montré des effets protecteurs de *Saccharomyces cerevisiae* vivante contre les dommages induit par le DON (*Alassane-Kpembi et al., 2018; Liu et al., 2019*). Cependant, les effets protecteurs de *Saccharomyces cerevisiae* semblent impliquer une métabolisation du DON par les levures, ce qui ne peut avoir lieu avec le YANG dans lequel *S. cerevisiae* est inactivée. Concernant *L. helveticus*, ses éventuels effets sur la toxicité induite par le DON n'ont à notre connaissance pas été étudiés alors que d'autres probiotiques vivants tels que *L. rhamnosus* et *L. plantarum* ont des effets protecteurs sur des explants intestinaux de porcs via la dégradation du DON ou la production de métabolites (*García et al., 2018; Maidana et al., 2021*).

Conclusion

En conclusion, notre étude fournit une preuve de concept de l'utilisation du modèle des monocouches de cellules d'organoïdes d'intestin de porcelet pour tester les effets de produits issus de micro-organismes au niveau du pôle apical des cellules. Ce nouveau modèle chez le porc nous a permis de confirmer que le butyrate a des effets importants sur les cellules épithéliales de porcelet. Certains de ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur les modèles classiquement utilisés *in vitro* mais il existe également d'importantes différences probablement liées à la diversité de types cellulaires et au niveau de différenciation dans les organoïdes Nous avons observé relativement peu d'effet des postbiotiques YANG et *L. helveticus* sur les cellules épithéliales intestinales de porcelets. Cependant,

les effets des produits testés semblent très dépendants des conditions de culture, montrant l'importance du choix des conditions expérimentales en fonction de la cible des produits à tester (cellules souches des cryptes ou cellules différenciés des villosités). Les concentrations des produits testés et leurs conditions d'utilisation restent également à optimiser, notamment pour le YANG qui n'était pas réparti de manière homogène sur les tapis. Cette étude nous a également permis de mettre en place un challenge par la mycotoxine DON permettant d'induire *in vitro* une perturbation de la fonction de barrière de l'épithélium, comme observé *in vivo* lors du sevrage précoce des porcelets. L'utilisation de ce modèle de dysfonction de la barrière épithéliale induite par le DON nous a permis d'identifier des effets potentiellement protecteurs du butyrate. En revanche, les cellules d'organoïdes de porcelets cultivés en 2D semblent résistantes à d'autres challenges (cytokines pro-inflammatoires) classiquement utilisés dans d'autres modèles cellulaires. Cette observation ouvre de nombreuses questions quant à la pertinence physiologique des différents modèles utilisés pour étudier l'épithélium intestinal du porcelet. D'autres challenges restent à tester pour induire une dysfonction de la barrière épithéliale mimant au plus proche ce qui est observé lors du sevrage des porcelets.

Abréviations

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium ; **DMSO :** diméthyl sulfoxide ; **DON :** Déoxynivalénol ; **H_2O_2 :** péroxyde d'hydrogène ; **HDAC :** histone désacétylase ; ***L. helveticus* :** *Lactobacillus helveticus* ; **LPS :** lipopolysaccharide ; **PBS :** phosphate-buffered saline ; **P/S :** Pénicilline / Streptomycine ; ***S. boulardii* :** *Saccharomyces boulardii* ; **SVF ou FBS :** sérum de veaux fœtal ou fetal bovine serum ; **TEER :** résistance électrique transépithéliale

Bibliographie

Alassane-Kpembi, I., Pinton, P., Hupé, J.-F., Neves, M., Lippi, Y., Combes, S., et al. (2018). Saccharomyces cerevisiae Boulardii Reduces the Deoxynivalenol-Induced Alteration of the Intestinal Transcriptome. Toxins 10, 199. doi: 10.3390/toxins10050199.

Alex, S., Lange, K., Amolo, T., Grinstead, J. S., Haakonsson, A. K., Szalowska, E., et al. (2013). Short-Chain Fatty Acids Stimulate Angiopoietin-Like 4 Synthesis in Human Colon Adenocarcinoma Cells by Activating Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ. Molecular and Cellular Biology 33, 1303–1316. doi: 10.1128/MCB.00858-12.

Bruewer, M., Luegering, A., Kucharzik, T., Parkos, C. A., Madara, J. L., Hopkins, A. M., et al. (2003). Proinflammatory Cytokines Disrupt Epithelial Barrier Function by Apoptosis-Independent Mechanisms 1. The Journal of Immunology 171, 6164–6172. doi: 10.4049/jimmunol.171.11.6164.

Czerucka, D., Dahan, S., Mograbi, B., Rossi, B., and Rampal, P. (2000). Saccharomyces boulardii Preserves the Barrier Function and Modulates the Signal Transduction Pathway Induced in Enteropathogenic Escherichia coli-Infected T84 Cells. Infection and Immunity 68, 5998–6004. doi: 10.1128/IAI.68.10.5998-6004.2000.

d'Aldebert, E., Quaranta, M., Sébert, M., Bonnet, D., Kirzin, S., Portier, G., et al. (2020). Characterization of Human Colon Organoids From Inflammatory Bowel Disease Patients. Front Cell Dev Biol 8, 363. doi: 10.3389/fcell.2020.00363.

Daly, K., and Shirazi-Beechey, S. P. (2006). Microarray Analysis of Butyrate Regulated Genes in Colonic Epithelial Cells. DNA and Cell Biology 25, 49–62. doi: 10.1089/dna.2006.25.49.

Foey, A., Habil, N., Strachan, A., and Beal, J. (2022). Lacticaseibacillus casei Strain Shirota Modulates Macrophage-Intestinal Epithelial Cell Co-Culture Barrier Integrity, Bacterial Sensing and Inflammatory Cytokines. Microorganisms 10, 2087. doi: 10.3390/microorganisms10102087.

Fusunyan, R. D., Quinn, J. J., Ohno, Y., MacDermott, R. P., and Sanderson, I. R. (1998). Butyrate Enhances Interleukin (IL)-8 Secretion by Intestinal Epithelial Cells in Response to IL-1β and Lipopolysaccharide. Pediatr Res 43, 84–90. doi: 10.1203/00006450-199801000-00013.

García, G. R., Payros, D., Pinton, P., Dogi, C. A., Laffitte, J., Neves, M., et al. (2018). Intestinal toxicity of deoxynivalenol is limited by Lactobacillus rhamnosus RC007 in pig jejunum explants. Arch Toxicol 92, 983–993. doi: 10.1007/s00204-017-2083-x.

Gaudier, E., Jarry, A., Blottière, H. M., de Coppet, P., Buisine, M. P., Aubert, J. P., et al. (2004). Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology 287, G1168–G1174. doi: 10.1152/ajpgi.00219.2004.

Ghareeb, K., Awad, W. A., Böhm, J., and Zebeli, Q. (2015). Impacts of the feed contaminant deoxynivalenol on the intestine of monogastric animals: poultry and swine. Journal of Applied Toxicology 35, 327–337. doi: 10.1002/jat.3083.

Goossens, J., Pasmans, F., Verbrugghe, E., Vandenbroucke, V., De Baere, S., Meyer, E., et al. (2012). Porcine intestinal epithelial barrier disruption by the Fusariummycotoxins deoxynivalenol and T-2 toxin promotes transepithelial passage of doxycycline and paromomycin. BMC Vet Res 8, 245. doi: 10.1186/1746-6148-8-245.

Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Fleury, M. A., Van de Wiele, T., Forano, E., and Blanquet-Diot, S. (2017). Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health. Trends in Microbiology 25, 851–873. doi: 10.1016/j.tim.2017.05.004.

Grouls, M., Janssen, A. W. F., Duivenvoorde, L. P. M., Hooiveld, G. J. E. J., Bouwmeester, H., and van der Zande, M. (2022). Differential gene expression in iPSC-derived human intestinal epithelial cell layers following exposure to two concentrations of butyrate, propionate and acetate. Sci Rep 12, 13988. doi: 10.1038/s41598-022-17296-8.

Habil, N., Abate, W., Beal, J., and Foey, A. d. (2014). Heat-killed probiotic bacteria differentially regulate colonic epithelial cell production of human β-defensin-2: dependence on inflammatory cytokines. Beneficial Microbes 5, 483–495. doi: 10.3920/BM2013.0061.

Hanyu, H., Yokoi, Y., Nakamura, K., Ayabe, T., Tanaka, K., Uno, K., et al. (2020). Mycotoxin Deoxynivalenol Has Different Impacts on Intestinal Barrier and Stem Cells by Its Route of Exposure. Toxins 12, 610. doi: 10.3390/toxins12100610.

Hazime, H., Ducasa, G., Fernandez, I., Brito, N., Santander, A., Pignac-Kobinger, J., et al. (2022). EPITHELIAL DUOX2 ACTIVATION INCREASES GUT PERMEABILITY AND BACTERIAL TRANSLOCATION THAT IS RESCUED WITH BUTYRATE SUPPLEMENTATION. Gastroenterology 162, S49. doi: 10.1053/j.gastro.2021.12.102.

Iribarren, C., Nordlander, S., Sundin, J., Isaksson, S., Savolainen, O., Törnblom, H., et al. (2022). Fecal luminal factors from patients with irritable bowel syndrome induce distinct gene expression of colonoids. Neurogastroenterology & Motility 34, e14390. doi: 10.1111/nmo.14390.

Jelinsky, S. A., Derksen, M., Bauman, E., Verissimo, C. S., van Dooremalen, W. T. M., Roos, J. L., et al. (2023). Molecular and Functional Characterization of Human Intestinal Organoids and Monolayers for Modeling Epithelial Barrier. Inflammatory Bowel Diseases 29, 195–206. doi: 10.1093/ibd/izac212.

Johnson-Henry, K. C., Hagen, K. E., Gordonpour, M., Tompkins, T. A., and Sherman, P. M. (2007). Surface-layer protein extracts from Lactobacillus helveticus inhibit enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 adhesion to epithelial cells. Cellular Microbiology 9, 356–367. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00791.x.

Kaiko, G. E., Ryu, S. H., Koues, O. I., Collins, P. L., Solnica-Krezel, L., Pearce, E. J., et al. (2016). The Colonic Crypt Protects Stem Cells from Microbiota-Derived Metabolites. Cell 165, 1708–1720. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.018.

Knoop, K. A., and Newberry, R. D. (2018). Goblet cells: multifaceted players in immunity at mucosal surfaces. Mucosal Immunology 11, 1551–1557. doi: 10.1038/s41385-018-0039-y.

Kvale, D., and Brandtzaeg, P. (1995). Constitutive and cytokine induced expression of HLA molecules, secretory component, and intercellular adhesion molecule-1 is modulated by butyrate in the colonic epithelial cell line HT-29. Gut 36, 737–742. doi: 10.1136/gut.36.5.737.

Larraufie, P., Martin-Gallausiaux, C., Lapaque, N., Dore, J., Gribble, F. M., Reimann, F., et al. (2018). SCFAs strongly stimulate PYY production in human enteroendocrine cells. Sci Rep 8, 74. doi: 10.1038/s41598-017-18259-0.

Lin, R., Sun, Y., Mu, P., Zheng, T., Mu, H., Deng, F., et al. (2020). Lactobacillus rhamnosus GG supplementation modulates the gut microbiota to promote butyrate production, protecting against deoxynivalenol exposure in nude mice. Biochemical Pharmacology 175, 113868. doi: 10.1016/j.bcp.2020.113868.

Liu, Y., Chang, J., Wang, P., Yin, Q., Huang, W., Liu, C., et al. (2019). Effects of Saccharomyces cerevisiae on alleviating cytotoxicity of porcine jejunal epithelia cells induced by deoxynivalenol. AMB Express 9, 137. doi: 10.1186/s13568-019-0863-9.

Luo, S., Terciolo, C., Neves, M., Puel, S., Naylies, C., Lippi, Y., et al. (2021). Comparative sensitivity of proliferative and differentiated intestinal epithelial cells to the food contaminant, deoxynivalenol. Environ Pollut 277, 116818. doi: 10.1016/j.envpol.2021.116818.

Maidana, L. G., Gerez, J., Hohmann, M. N. S., Verri, W. A., and Bracarense, A. P. F. L. (2021). Lactobacillus plantarum metabolites reduce deoxynivalenol toxicity on jejunal explants of piglets. Toxicon 203, 12–21. doi: 10.1016/j.toxicon.2021.09.023.

Moeser, A. J., Klok, C. V., Ryan, K. A., Wooten, J. G., Little, D., Cook, V. L., et al. (2007). Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology 292, G173–G181. doi: 10.1152/ajpgi.00197.2006.

Mussard, E., Lencina, C., Boudry, G., Achard, C. S., Klotz, C., Combes, S., et al. (2023). Culture of Piglet Intestinal 3D Organoids from Cryopreserved Epithelial Crypts and Establishment of Cell Monolayers. J Vis Exp. doi: 10.3791/64917.

Mussard, E., Lencina, C., Gallo, L., Barilly, C., Poli, M., Feve, K., 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. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.983031 [Accessed September 16, 2022].

Nielsen, D. S. G., Jensen, B. B., Theil, P. K., Nielsen, T. S., Knudsen, K. E. B., and Purup, S. (2018). Effect of butyrate and fermentation products on epithelial integrity in a mucus-secreting human colon cell line. Journal of Functional Foods 40, 9–17. doi: 10.1016/j.jff.2017.10.023.

Noel, G., In, J. G., Lemme-Dumit, J. M., DeVine, L. R., Cole, R. N., Guerrerio, A. L., et al. (2021). Human Breast Milk Enhances Intestinal Mucosal Barrier Function and Innate Immunity in a Healthy Pediatric Human Enteroid Model. Frontiers in Cell and Developmental Biology 9. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.685171 [Accessed March 22, 2023].

Oshima, T., Sasaki, M., Kataoka, H., Miwa, H., Takeuchi, T., and Joh, T. (2007). Wip1 protects hydrogen peroxide-induced colonic epithelial barrier dysfunction. Cell. Mol. Life Sci. 64, 3139–3147. doi: 10.1007/s00018-007-7268-7.

Ozaka, S., Sonoda, A., Ariki, S., Kamiyama, N., Hidano, S., Sachi, N., et al. (2021). Protease inhibitory activity of secretory leukocyte protease inhibitor ameliorates murine experimental colitis by protecting the intestinal epithelial barrier. Genes to Cells 26, 807–822. doi: 10.1111/gtc.12888.

Pearce, S. C., Weber, G. J., van Sambeek, D. M., Soares, J. W., Racicot, K., and Breault, D. T. (2020). Intestinal enteroids recapitulate the effects of short-chain fatty acids on the intestinal epithelium. PLoS One 15, e0230231. doi: 10.1371/journal.pone.0230231.

Peng, L., He, Z., Chen, W., Holzman, I. R., and Lin, J. (2007). Effects of Butyrate on Intestinal Barrier Function in a Caco-2 Cell Monolayer Model of Intestinal Barrier. Pediatr Res 61, 37–41. doi: 10.1203/01.pdr.0000250014.92242.f3.

Pié, S., Lallès, J. P., Blazy, F., Laffitte, J., Sève, B., and Oswald, I. P. (2004). Weaning Is Associated with an Upregulation of Expression of Inflammatory Cytokines in the Intestine of Piglets. The Journal of Nutrition 134, 641–647. doi: 10.1093/jn/134.3.641.

Pinton, P., and Oswald, I. P. (2014). Effect of Deoxynivalenol and Other Type B Trichothecenes on the Intestine: A Review. Toxins 6, 1615–1643. doi: 10.3390/toxins6051615.

Piqué, N., Berlanga, M., and Miñana-Galbis, D. (2019). Health Benefits of Heat-Killed (Tyndallized) Probiotics: An Overview. International Journal of Molecular Sciences 20, 2534. doi: 10.3390/ijms20102534.

Qiu, Y., Yang, J., Wang, L., Yang, X., Gao, K., Zhu, C., et al. (2021). Dietary resveratrol attenuation of intestinal inflammation and oxidative damage is linked to the alteration of gut microbiota and butyrate in piglets challenged with deoxynivalenol. Journal of Animal Science and Biotechnology 12, 71. doi: 10.1186/s40104-021-00596-w.

Rawling, M., Leclercq, E., Foey, A., Castex, M., and Merrifield, D. (2021). A novel dietary multi-strain yeast fraction modulates intestinal toll-like-receptor signalling and mucosal responses of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). PLOS ONE 16, e0245021. doi: 10.1371/journal.pone.0245021.

Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., et al. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the

definition and scope of postbiotics. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 18, 649–667. doi: 10.1038/s41575-021-00440-6.

Salvi, P. S., and Cowles, R. A. (2021). Butyrate and the Intestinal Epithelium: Modulation of Proliferation and Inflammation in Homeostasis and Disease. Cells 10, 1775. doi: 10.3390/cells10071775.

Senger, S., Ingano, L., Freire, R., Anselmo, A., Zhu, W., Sadreyev, R., et al. (2018). Human Fetal-Derived Enterospheres Provide Insights on Intestinal Development and a Novel Model to Study Necrotizing Enterocolitis (NEC). Cell Mol Gastroenterol Hepatol 5, 549–568. doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.01.014.

Sherman, P. M., Johnson-Henry, K. C., Yeung, H. P., Ngo, P. S. C., Goulet, J., and Tompkins, T. A. (2005). Probiotics Reduce Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7- and Enteropathogenic E. coli O127:H6-Induced Changes in Polarized T84 Epithelial Cell Monolayers by Reducing Bacterial Adhesion and Cytoskeletal Rearrangements. Infection and Immunity 73, 5183–5188. doi: 10.1128/IAI.73.8.5183-5188.2005.

Srinivasan, B., Kolli, A. R., Esch, M. B., Abaci, H. E., Shuler, M. L., and Hickman, J. J. (2015). TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. J Lab Autom 20, 107–126. doi: 10.1177/2211068214561025.

Terciolo, C., Dobric, A., Ouaissi, M., Siret, C., Breuzard, G., Silvy, F., et al. (2017). Saccharomyces boulardii CNCM I-745 Restores intestinal Barrier Integrity by Regulation of E-cadherin Recycling. Journal of Crohn's and Colitis 11, 999–1010. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjx030.

Tong, X., Yin, L., and Giardina, C. (2004). Butyrate suppresses Cox-2 activation in colon cancer cells through HDAC inhibition. Biochemical and Biophysical Research Communications 317, 463–471. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.03.066.

Ueo, T., Imayoshi, I., Kobayashi, T., Ohtsuka, T., Seno, H., Nakase, H., et al. (2012). The role of Hes genes in intestinal development, homeostasis and tumor formation. Development 139, 1071–1082. doi: 10.1242/dev.069070.

Upadhaya, S. D., Bravo de Laguna, F., Bertaud, B., and Kim, I.-H. (2019). Multi-strain yeast fraction product supplementation can alleviate weaning stress and improve performance and health of piglets raised under low sanitary conditions. Journal of the Science of Food and Agriculture 99, 6076–6083. doi: 10.1002/jsfa.9885.

van Beers-Schreurs, H. M. G., Nabuurs, M. J. A., Vellenga, L., Valk, H. J. K. der, Wensing, T., and Breukink, H. J. (1998). Weaning and the Weanling Diet Influence the Villous Height and Crypt Depth in the Small Intestine of Pigs and Alter the Concentrations of Short-Chain Fatty Acids in the Large Intestine and Blood. The Journal of Nutrition 128, 947–953. doi: 10.1093/jn/128.6.947.

van der Hee, B., and Wells, J. M. (2021). Microbial Regulation of Host Physiology by Short-chain Fatty Acids. Trends Microbiol 29, 700–712. doi: 10.1016/j.tim.2021.02.001.

Vancamelbeke, M., Laeremans, T., Vanhove, W., Arnauts, K., Ramalho, A. S., Farré, R., et al. (2019). Butyrate Does Not Protect Against Inflammation-induced Loss of Epithelial Barrier Function and Cytokine Production in Primary Cell Monolayers From Patients With Ulcerative Colitis. Journal of Crohn's and Colitis 13, 1351–1361. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjz064.

Wang, R. X., Lee, J. S., Campbell, E. L., and Colgan, S. P. (2020a). Microbiota-derived butyrate dynamically regulates intestinal homeostasis through regulation of actin-associated protein

synaptopodin. Proceedings of the National Academy of Sciences 117, 11648–11657. doi: 10.1073/pnas.1917597117.

Wang, S., Zhang, C., Yang, J., Wang, X., Wu, K., Zhang, B., et al. (2020b). Sodium Butyrate Protects the Intestinal Barrier by Modulating Intestinal Host Defense Peptide Expression and Gut Microbiota after a Challenge with Deoxynivalenol in Weaned Piglets. J. Agric. Food Chem. 68, 4515–4527. doi: 10.1021/acs.jafc.0c00791.

Wine, E., Gareau, M. G., Johnson-Henry, K., and Sherman, P. M. (2009). Strain-specific probiotic (Lactobacillus helveticus) inhibition of Campylobacter jejuni invasion of human intestinal epithelial cells. FEMS Microbiology Letters 300, 146–152. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01781.x.

Xiao, Y., Wang, J., Wang, J., Wang, H., Wu, S., and Bao, W. (2022). Analysis of the roles of the Notch1 signalling pathway in modulating deoxynivalenol cytotoxicity. Ecotoxicology and Environmental Safety 246, 114183. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.114183.

Yan, H., and Ajuwon, K. M. (2017). Butyrate modifies intestinal barrier function in IPEC-J2 cells through a selective upregulation of tight junction proteins and activation of the Akt signaling pathway. PLOS ONE 12, e0179586. doi: 10.1371/journal.pone.0179586.

Zeng, J., Jiang, J., Zhu, W., and Chu, Y. (2016). Heat-killed yogurt-containing lactic acid bacteria prevent cytokine-induced barrier disruption in human intestinal Caco-2 cells. Ann Microbiol 66, 171–178. doi: 10.1007/s13213-015-1093-2.

Discussion générale et Perspectives

En élevage porcin, le sevrage peut conduire à une dysfonction de la barrière de l'épithélium intestinal favorisant l'émergence de diarrhées. L'utilisation courante d'antibiotiques pour lutter contre ces troubles digestifs contribue à l'émergence de pathogènes résistants aux antibiotiques. Il est donc essentiel de rechercher des alternatives non-antibiotiques pour renforcer la barrière épithéliale du porcelet au moment du sevrage. Parmi celles-ci, des composés dérivés de micro-organismes appelés postbiotiques suscitent un intérêt grandissant. Cependant, leurs effets sur l'épithélium intestinal du porcelet sont peu décrits, notamment en raison du manque de modèles d'étude appropriés.

Ainsi, le but des travaux de thèse était de **développer et caractériser un modèle de culture d'organoïdes d'intestin de porcelet permettant de tester les effets de postbiotiques ciblant la fonction de barrière de l'épithélium intestinal.** Les travaux présentés dans cette thèse visaient à répondre à **trois objectifs principaux : (i) déterminer si les organoïdes d'intestin de porcelets conservent *in vitro* les caractéristiques de leur segment digestif et de leur stade de développement d'origine ; (ii) mettre au point un modèle de culture de monocouches de cellules d'organoïdes d'intestin de porcelet reproductible et permettant de mimer la dysfonction de la barrière épithéliale observée lors du sevrage ; et (iii) apporter la preuve de concept que le modèle de monocouches de cellules d'organoïdes d'intestin de porcelet peut être utilisé pour tester les effets de postbiotiques ciblant la fonction de barrière de l'épithélium intestinal.**

La discussion débute par une justification de certains choix techniques concernant la culture d'organoïdes d'intestin de porc cultivés en 3D. Ensuite, le maintien de l'identité du segment digestif et du stade de développement dans les organoïdes de porcelets est discuté. La partie suivante analyse la mise en place du modèle de monocouches de cellules d'organoïdes et les tentatives d'induction d'une dysfonction de la barrière épithéliale, en évaluant les points forts et les points faibles des protocoles présentés. Enfin, l'intérêt de ce système de culture de monocouches de cellules d'organoïdes de porcelets pour tester des postbiotiques est discuté en prenant en compte les avantages et les limites en comparaison des modèles alternatifs existants. Enfin, des perspectives d'amélioration de la caractérisation du modèle d'organoïdes d'intestin de porcelets et de leur complexification sont proposées.

Choix et justifications techniques pour la culture en 3D des organoïdes d'intestin de porc

Choix du milieu de culture

Le milieu de culture des organoïdes intestinaux permet de reproduire *in vitro* la niche des cellules souches en ciblant notamment les voies Wnt, BMP et EGF (*Gehart and Clevers, 2019*). Pour cela, les milieux contiennent des inhibiteurs pharmacologiques et des protéines recombinantes purifiées ou issues de milieux conditionnés de lignées cellulaires. Par exemple, la lignée L-WRN sécrète les protéines Wnt3a, R-spondine et Noggin et permet la culture d'organoïdes intestinaux de nombreuses espèces (*Powell and Behnke, 2017*). Au début du projet de thèse, des données préliminaires avaient été obtenues au laboratoire sur des organoïdes d'intestin de porc cultivés avec du milieu conditionné L-WRN (Beaumont et al., 2021a). Cependant, lors d'une des premières expériences de la thèse, nous n'avons obtenu aucun organoïde lors de l'utilisation d'un nouveau lot de milieu L-WRN que nous avions produit, probablement en raison d'une concentration trop faible des protéines d'intérêt dans le milieu. Cet échec montre que l'utilisation de milieux conditionnés nécessite de réaliser des contrôles qualité stricts, par exemple en dosant la concentration des protéines cibles par ELISA ou en testant l'activité Wnt avec des lignées rapportrices (*Warschkau et al., 2022*). Cependant, ces contrôles qualité et la production des milieux demandent un travail quotidien très important. Dans ce contexte, nous avons donc fait le choix de cultiver nos organoïdes d'intestin de porc dans le milieu commercial IntestiCult™ Organoid Growth Medium (OGM) (Human) commercialisé par la société Stem Cell Technologies. Ce milieu de culture initialement développé pour la culture d'organoïdes humain avait été utilisé

précédemment pour la culture des organoïdes porcins (*Derricott et al., 2019; Vermeire et al., 2021*) (***Chapitre 3, Tableau 2***). Les avantage du milieu IntestiCult™ OGM sont la standardisation de sa composition selon des standards industriels et son format prêt à l'emploi. Néanmoins, le coût de ce milieu est très élevé (environ 450 €/100 mL), sa composition n'est pas décrite et il n'est pas possible d'ajuster sa composition. De plus, ce milieu est conçu pour favoriser la prolifération ce qui pourrait ne pas être optimal pour étudier les fonctions des cellules épithéliales différenciées (discuté ci-dessous).

Création d'une biobanque d'organoïdes et de cryptes cryoconservées

Une limite importante des études précédentes ayant caractérisé les organoïdes d'intestin de porc est d'avoir utilisé un faible de nombre de porcs à l'origine des organoïdes (*Mohammad et al., 2020; van der Hee et al., 2020; Barnett et al., 2021*). Nous avons donc fait le choix de mettre en place une biobanque d'organoïdes de jéjunum et de côlon issus de 12 porcelets allaités et 12 porcelets sevrés. A notre connaissance aucune étude publiée chez le porc ne réfère à l'utilisation d'une biobanque aussi importante. Cette biobanque a été suffisante pour toutes les expériences de cette thèse et pour les autres projets du laboratoire utilisant ce modèle, y compris dans le cadre de collaborations. Nous avons congelé systématiquement les organoïdes obtenus afin de maintenir notre biobanque d'intestin de porcelets. La constitution de cette biobanque a donc nettement contribué à réduire les prélèvements sur des porcs. Cependant, le Matrigel® et le SVF utilisés pour la culture des organoïdes sont également issus d'animaux (souris et veaux). L'identification d'alternatives à ces composants sera donc nécessaire pour que les organoïdes d'intestin de porc puissent être utilisés comme un véritable outil de réduction de l'expérimentation animale.

La constitution de notre biobanque d'organoïdes d'intestin de porcelets s'est échelonné sur plusieurs mois car notre capacité à mettre en culture simultanément des cryptes fraiches était limitée pour des raisons pratiques à 2 segments digestifs de 4 porcs (8 lignées d'organoïdes en parallèle). Cette contrainte nous a motivé à développer par la suite la culture d'organoïdes à partir des cryptes congelées que nous avions conservées en prévision de la mise au point de cette méthode (***Article 2***). Avec cette technique à disposition au début de la thèse, nous aurions pu faire les prélèvements sur tous nos porcelets allaités ou sevrés simultanément (n=12/groupe), ce qui aurait grandement facilité l'organisation du travail. Cependant, il pourrait y avoir des différences de phénotype entre les organoïdes de porcelets issus de cryptes fraiches ou de cryptes congelées. En effet, la densité initiale d'organoïdes est nettement plus faible à partir de cryptes congelées, ce qui suggère une sélection de certaines cellules souches résistantes à la congélation. L'ensemble des cryptes que nous avons congelé a considérablement enrichi notre biobanque puisqu'elles sont disponibles pour les 4 segments digestifs des 24 porcelets, représentant au total une capacité de culture d'une centaine de lignées d'organoïdes.

Comptage des cellules et reproductibilité

Au début de la thèse, lors de la création de la biobanque, nous dissocions les organoïdes en fragments lors des passages et nous les ensemencions après une dilution dont le facteur était estimé en fonction de la densité de la culture. Cette technique de passage rapide et simple permettait aux organoïdes de se reformer rapidement. Cependant, la densité des organoïdes était difficilement reproductible au cours des différents passages et en fonction des individus. Par la suite, nous avons donc dissocié les organoïdes en cellules isolées afin de les compter pour standardiser le nombre de cellules ensemencées. Dans ces conditions, nous avons fortement amélioré la reproductibilité de la densité des organoïdes pour chaque expérience et ce paramètre est crucial dans la mesure où cela influence fortement la morphologie des organoïdes (plus les organoïdes sont denses, plus ils sont sphériques). Cependant, nous avons constaté une croissance initiale des organoïdes un peu plus lente lorsqu'ils sont issus de cellules isolées par rapport à des fragments.

I - Capacité des organoïdes d'intestin de porcelets allaités et sevrés à maintenir les caractéristiques du tissu d'origine

Le but des modèles organoïdes est de mimer au mieux les caractéristiques des tissus d'origine. Certaines études ont comparé le phénotype des organoïdes d'intestin de porc à leur tissus d'origine par analyse de l'expression de gènes (*Mohammad et al., 2020; van der Hee et al., 2020; Barnett et al., 2021*). Cependant, ces études ont été réalisées sur un faible nombre d'individus (n = 2-3), ce qui ne permet pas de prendre en compte la variabilité entre les individus. Pourtant, un des principaux avantages des organoïdes par rapport aux lignées cellulaires est le maintien de la variabilité inter-individuelle *in vitro* dans la mesure où chaque lignée d'organoïdes conserve le génome de l'individu d'origine (*Mohammadi et al., 2021*). Pour prendre en compte cette variabilité inter-individuelle, nous avons donc créé une biobanque d'organoïdes issus d'un nombre d'individus nettement plus important que dans les études précédentes (12 porcelets allaités et 12 porcelets sevrés). Dans nos analyses statistiques, nous avons aussi systématiquement utilisé des modèles linéaires mixtes nous permettant de corriger cette variabilité inter-individuelle.

L'analyse de l'expression de 89 gènes choisis pour cibler la diversité des types cellulaires et des fonctions de l'épithélium intestinal nous a permis de montrer que les profils d'expression de gènes sont différents entre les cryptes et les organoïdes (***Figure 52***). Ces différences *in vitro* versus *in vivo* ont déjà été observées dans d'autres études (*Kraiczy et al., 2019; Navis et al., 2019; van der Hee et al., 2020; Mohammadi et al., 2021*) et pourraient s'expliquer par l'absence dans le milieu de culture des organoïdes de facteurs auxquels les cellules épithéliales sont exposées *in vivo* (détaillés ci-dessous). Il est intéressant de constater que les organoïdes de côlon de porcelets semblent plus distants de leurs cryptes d'origine que les organoïdes de jéjunum. Cela pourrait être lié à une influence plus forte de l'environnement luminal sur l'expression des gènes dans l'épithélium du côlon, peut-être en lien avec la densité du microbiote dans ce segment. Par ailleurs, nous avons observé une évolution des profils d'expression de gènes dans les organoïdes au cours des passages, dans le sens d'un éloignement des cryptes d'origines (***Figure 52***). Ces résultats sont en accords avec ceux obtenus sur des organoïdes humains et pourraient s'expliquer par l'effacement progressif de marques épigénétiques ou par la réduction du niveau d'activation de certaines voies de signalisation au cours du temps en l'absence de stimulation exogène (*Mohammadi et al., 2021*). Il serait intéressant d'étudier ces profils d'expression de gènes sur un plus grand nombre de passage pour déterminer si le transcriptome se stabilise ou s'il continue à dériver au cours de la culture.

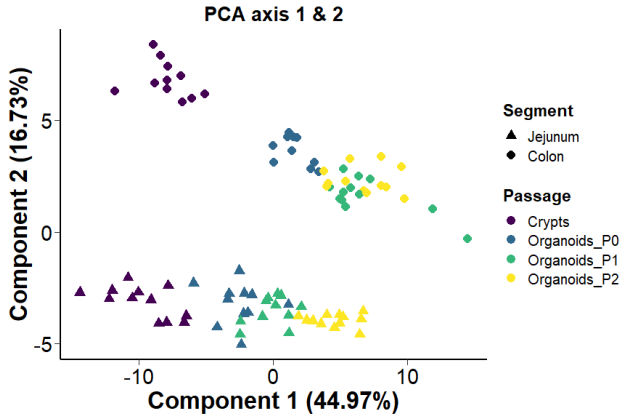


FIGURE 52 : ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE DE L'EXPRESSION DE GENES DANS LES CRYPTES ET LES ORGANOÏDES INTESTINAUX DE PORCELETS ALLAITES.

Analyse en composante principale de l'expression de 89 gènes dans les cryptes et les organoïdes de jéjunum et de colon de porcelets allaités. Les données sont identiques à celles présentées dans la figure 2D de la publication Mussard et al. (2022). Les symboles indiquent le segment digestif (jéjunum ou côlon). La couleur indique le type d'échantillons (cryptes ou organoïdes lors de la primoculture [P0] ou après un passage [P1] ou après deux passages [P2]).

A partir de ces observations, nous avons fait le choix de ne pas comparer directement les niveaux d'expression des gènes dans les cryptes et dans les organoïdes mais d'évaluer dans les organoïdes le maintien des profils d'expression spécifiques au segment digestif ou au stade de développement observés dans les cryptes (***Article 1***).

I-1. Les organoïdes d'intestin de porcelet maintiennent-ils l'identité du segment digestif d'origine ?

Comme décrit dans la littérature, nous avons observé des différences marquées d'expression de gènes entre les cryptes de jéjunum et de côlon issues de porcelets allaités (*Middendorp et al., 2014; Barnett et al., 2021*). Comme attendu, les gènes impliqués dans les fonctions de digestion (*LCT, SI*) ou de transport des nutriments (*GLUT2, FABP2*) étaient plus exprimés dans le jéjunum. Au contraire, certains gènes impliqués dans l'immunité innée (*TLR4, NOX1, DUOX2, MUC2*) ou dans le transport de l'eau (*AQP8*) étaient plus exprimés dans le côlon, en lien avec les principales fonctions de ce segment. Peu d'études avaient décrit l'expression régionale de gènes dans l'épithélium intestinal porcin (*Barnett et al., 2021*), ces données constituent donc une source d'information de l'expression des gènes spécifique d'un segment intetsinal chez le porc.

Dans notre étude, les organoïdes ont retenu à tous les passages environ 50 % des profils d'expression des gènes qui étaient différentiellement exprimés dans les cryptes du jéjunum et du côlon. Cet ordre de grandeur est similaire à celui décrit dans des études précédentes chez l'homme ou la souris (*Middendorp et al., 2014; Kraiczy et al., 2019*). Les gènes différentiellement exprimés entre le jéjunum et le côlon dans les cryptes et les organoïdes étaient impliqués dans différentes fonctions telles que le transport de nutriment (*PEPT1, FABP2*) ou l'immunité innée (*TLR2, TLR4, LYZ*). D'autres études ont également décrit que les organoïdes d'iléon et de côlon de porcs conservent en partie l'expression de gènes spécifiques à la localisation dans l'intestin (*Barnett et al., 2021*). Ces résultats suggèrent donc qu'une partie de l'identité du segment intestinal est intrinsèquement programmée au niveau des cellules souches porcines. En effet, la régionalisation de l'intestin commence au stade fœtal, indépendamment des facteurs environnementaux tels que le mésenchyme sous-jacent, les nutriments ou le microbiote qui sont absents dans l'environnement *in vitro* (*Thompson et al., 2018; Heppert et al., 2021*). Cette identité épithéliale spécifique du segment digestif implique notamment des marques épigénétiques (*Heppert et al., 2021*). Dans ce contexte, en collaboration avec une équipe de notre unité spécialisée en épigénétique, nous avons montré que la triméthylation de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4me3) n'était pas impliquée dans le maintien du profil d'expression spécifique du segment digestif dans les organoïdes pour les gènes *TLR4* et *LYZ*. Il serait donc intéressant (i) de confirmer ces résultats pour d'autres gènes dont le profil d'expression spécifique du segment digestif est maintenu *in vitro* et (ii) d'étudier d'autres marques épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN qui a précédemment été décrite comme étant impliquée dans le maintien de l'identité régionale dans des organoïdes intestinaux humain (*Kraiczy et al., 2019*).

Par ailleurs, le profil d'expression d'autres gènes différentiellement exprimés en fonction du segment digestif *in vivo* n'a été conservé qu'à certains passages dans les organoïdes (*LCT, GLUT2, NEUROG3*) ou n'ont jamais été conservé dans les organoïdes pour d'autres gènes (*MUC2, DUOX2*). Le milieu de culture IntestiCult™ OGM que nous avons utilisé est optimisé pour favoriser la prolifération des cellules ce qui maintient théoriquement les organoïdes dans un état peu différencié. Des études antérieures avaient montré que la différenciation des organoïdes pouvait être nécessaire pour observer l'expression spécifique du segment digestif de certains gènes (*Middendorp et al., 2014; Zietek et al., 2020*). Nous avons donc fait l'hypothèse que la différenciation des organoïdes de porc pourrait permettre de retrouver certains profils d'expression spécifiques du segment digestif observés dans les cryptes. La différenciation des organoïdes à l'aide d'un milieu de culture ne contenant pas les facteurs nécessaires à la prolifération des cellules souches a permis d'observer les profils d'expression spécifiques à la localisation de certains gènes, tel que *LCT* et *GLUT2*. Cependant, la différenciation

n'était pas toujours suffisante pour reproduire les profils d'expressions spécifiques du segment digestif (*MUC2* ou *CCL5*). Ces derniers gènes sont probablement régulés *in vivo* par des signaux environnementaux tels que des nutriments, le microbiote et ses métabolites ou par des signaux issus des cellules non-épithéliales qui ne sont pas reproduits dans les organoïdes

L'ajout dans le milieu de culture des organoïdes de composés présents spécifiquement dans l'environnement luminal du segment digestif ciblé pourrait être utile pour reproduire plus fidèlement *in vitro* le phénotype spécifique de la localisation dans l'intestin. Par exemple, nos analyses de métabolome et de microbiote du jéjunum et du côlon chez les porcelets à l'origine des organoïdes suggèrent que l'ajout d'acides gras à courtes chaînes (isobutyrate, acétate, propionate) ou des bactéries de la famille des *Ruminococcaceae* ou *Prevotellaceae* permettrait peut-être d'induire l'expression de gènes spécifiques au côlon. Bien que la faisabilité de la co-culture de bactéries du microbiote avec des organoïdes 3D murins par microinjection ait été démontrée (*Williamson et al., 2018*), cette technique reste difficile à mettre en œuvre notamment en raison de la sensibilité à l'oxygène de nombreuses bactéries du microbiote intestinal. L'ajout de métabolites bactériens dans le milieu de culture des organoïdes est nettement plus simple à mettre en œuvre et mériterait d'être testé.

Par ailleurs, les cellules immunitaires de la *lamina propria* pourraient également fournir des signaux aux cellules épithéliales modulant l'expression des gènes de manière spécifique au segment digestif. La co-culture des organoïdes intestinaux avec des cellules immunitaires de porc permettrait peut-être de retrouver certains profils d'expressions spécifiques de la localisation dans l'intestin par exemple pour des gènes liés à l'immunité innée. Des modèles de co-culture d'organoïdes 3D intestinaux avec des cellules immunitaires ont déjà été mis en place chez l'homme et la souris (*Nozaki et al., 2016; Staab et al., 2020; Subtil et al., 2023*). Le développement de ce type de modèle nécessiterait l'isolement des cellules immunitaire de la *lamina propria* et l'identification d'un milieu de culture permettant le maintien à la fois des cellules épithéliales et immunitaires en culture.

Nous avons caractérisé les organoïdes de jéjunum et de côlon uniquement par des mesures d'expression de gènes. Cette caractérisation pourrait être complétée par des tests fonctionnels. Par exemple, nous avons observé que l'expression régionale du TLR4 (récepteur du LPS) est bien maintenue dans les organoïdes de porcelets. Une étude antérieure a observé que les organoïdes dérivées de côlon murins répondaient à une stimulation au LPS contrairement à ceux issus du jéjunum, indiquant une détection du LPS spécifique du segment digestif, en lien avec le profil d'expression du TLR4 (*Kayisoglu et al., 2021b*). Il serait donc intéressant d'étudier la réponse au LPS dans notre modèle d'organoïdes d'intestin de porcelet en fonction des segments.

Globalement, nos résultats montrent que les organoïdes intestinaux de porcelets allaités peuvent être utilisés pour l'étude de certains mécanismes spécifiques du segment intestinal, en lien avec les réponses immunitaires innées tel que décrit pour le TLR4 mais aussi pour le transport de nutriments (PEPT1) ou d'immunoglobulines (PIGR). Cependant, ces approches seraient probablement plus pertinentes dans le système de culture en monocouche détaillé ci-dessous, en raison de l'importance du contrôle de la voie d'exposition de l'épithélium pour ces tests fonctionnels. A l'inverse, d'autres gènes ne semblent pas pouvoir être étudiés de manière spécifique au segment, tel que l'enzyme de défense pro-oxydante *DUOX2* dont le profil d'expression spécifique du segment digestif n'est pas maintenu dans les organoïdes.

I-2. Les organoïdes d'intestin de porcelet maintiennent-ils les caractéristiques du stade de développement d'origine ?

Comme décrit dans la littérature, nous avons observé des différences d'expression de gènes dans les cryptes de jéjunum de porcelets allaités (21 jours) et sevrés (35 jours), bien que ces différences soient nettement moins nombreuses que pour la comparaison entre les segments digestifs. Nous attendions

des différences plus marquées entre les porcelets allaités et sevrés, mais ces résultats d'ampleur modérée pourraient s'expliquer par l'effet transitoire du sevrage sur l'expression de gènes dans l'intestin, maximal après 2-3 jours après le sevrage (*Pié et al., 2004*), alors que nous avons effectué nos prélèvements une semaine après le sevrage. De plus, les porcelets de notre étude ont été sevrés à 28 jours alors que les effets du sevrage sont plus marqués à 21 jours dans la littérature (*Marion et al., 2005; Moeser et al., 2007a; Smith et al., 2010; Wijtten et al., 2011*). Nos résultats reflètent l'activation de l'immunité innée de l'épithélium après le sevrage avec une augmentation de l'expression des gènes du peptide antimicrobien REG3G, des enzymes redox (*DUOX2, DUOXA2, NOX1*) et d'autres régulateurs de la fonction barrière (*CGN, SLPI, CCL5*). Nous aurions peut-être observé des différences d'expression de gènes plus importantes avec des échantillons prélevés sur des animaux à des stades de développement plus distants. Par exemple, une étude chez le porc a montré une différence d'expression du gène de la lactase (*LCT*) entre le jéjunum de porc de 7 jours et de 35 jours, alors que ce gène n'était pas différentiellement exprimé dans nos données (*Mohammad et al., 2020*). De plus, nous avons étudié l'expression des gènes uniquement au niveau de cryptes du jéjunum qui ont été utilisées pour obtenir des organoïdes, alors que les cellules différenciées du jéjunum se situent majoritairement dans les villosités. Nous aurions ainsi peut-être observé plus de différences en fonction du stade de développement en analysant l'expression des gènes dans l'ensemble de l'épithélium intestinal du jéjunum.

Nos résultats ont montré que les organoïdes du jéjunum de porcelets allaités et sevrés ne retenaient pas l'identité liée au stade de développement d'origine. Peu d'études ont caractérisé des organoïdes issus de différents stades de développement post-natal, que ce soit chez l'homme, la souris ou le porc. Cependant, une étude chez le porc a montré que les organoïdes de jéjunum ne conservaient pas l'expression liée à l'âge de gènes codant pour des enzymes digestives (*Mohammad et al., 2020*). Contrairement à la comparaison entre les segments digestifs, la différenciation des organoïdes ne nous a pas permis de retrouver les différences observées *in vivo* en fonction de l'âge, comme par exemple pour le gène de la sucrase isomaltase (*SI*) qui était plus exprimé après le sevrage. De manière intéressante, le seul gène dont le profil d'expression spécifique du stade de développement était maintenu dans les organoïdes était *SLPI*, codant pour un inhibiteur de protéase et régulant la fonction de barrière de l'intestin (*Ozaka et al., 2021*). Le rôle de ce gène dans le contexte du sevrage n'est pas connu et les organoïdes de porc pourraient donc être un bon modèle pour l'étudier.

Les mécanismes impliqués dans la régulation de l'identité liée au stade de développement ne sont probablement pas les mêmes que ceux mis en jeu pour le maintien de l'identité régionale (*Heppert et al., 2021*). Nos résultats suggèrent que l'identité du stade de développement pourrait principalement être régulée par des signaux extérieurs à la cellule épithéliale et spécifiquement présents chez les porcelets allaités ou sevrés. Comme proposé ci-dessus pour la localisation dans l'intestin, certains des profils d'expressions de gènes spécifiques du stade de développement pourrait être retrouvés en cultivant les organoïdes en présence de nutriments spécifiques du stade de développement. Par exemple, ajouter des oligosaccharides végétaux dans le milieu de culture des organoïdes pourrait peut-être induire l'expression de la sucrase isomaltase qui était plus exprimée après le sevrage *in vivo*. Cependant, nous pouvons aussi faire l'hypothèse qu'une combinaison de facteurs environnementaux déterminent l'expression de gènes spécifiques du segment digestif. Il serait donc intéressant de cultiver les organoïdes en présence de solutions stériles obtenues à partir contenus intestinal de porcelets allaités ou sevrés pour mimer l'ensemble des composés solubles susceptibles d'agir sur l'épithélium, comme décrit précédemment chez le lapin (*Beaumont et al., 2020*).

Par ailleurs, nous avons étudié les effets du sevrage uniquement au niveau du jéjunum, alors que tous les segments digestifs sont affectés par le sevrage d'après la littérature (*Moeser et al., 2017*). Nous avions initialement prévu des réaliser la comparaison avant/après sevrage au niveau du côlon, cependant les cultures d'organoïdes de côlon de porcelets sevrés étaient fréquemment contaminées. L'observation de contamination uniquement pour la culture des organoïdes de côlon de porcelets sevrés nous laisse penser que ces contaminations provenaient probablement du microbiote qui est

nettement plus diversifié à ce stade. Nous avons ainsi par la suite ajouté de l'amphotéricine B (antifongique) dans le milieu de culture des organoïdes en plus des antibiotiques pénicilline/streptomycine, ce qui nous a permis d'obtenir des organoïdes de côlon pour 4 porcelets sevrés. Cependant, nous avons jugé cet effectif insuffisant pour faire la comparaison des organoïdes de côlon de porcelets allaités et sevrés.

De la même manière que pour la comparaison des segments digestifs, nous avons caractérisé les organoïdes seulement par analyse d'expression de gènes par qPCR. Des tests fonctionnels permettraient de compléter la caractérisation des organoïdes et d'étudier le maintien des fonctions spécifiques au stade de développement. Par exemple, le traitement des organoïdes avec de la Forskoline permet d'ouvrir les canaux CFTR et d'induire un gonflement des organoïdes via la sécrétion d'ions (*Dekkers et al., 2013; Boj et al., 2017; Vonk et al., 2020*). Il pourrait donc être intéressant de tester si les organoïdes issus de porcelets allaités ou sevrés peuvent être utilisés pour modéliser les capacités de sécrétion passant par les canaux CFTR connues pour être perturbées lors du sevrage (*Moeser et al., 2017*).

II – Développement d'un modèle de culture de cellules d'organoïdes en monocouche et induction d'une dysfonction de la barrière épithéliale

Le but de la thèse était de développer un système de culture de l'épithélium intestinal du porcelet permettant d'étudier les effets de postbiotiques apportés par l'alimentation. Le pôle apical des cellules n'étant pas accessible dans les organoïdes en 3D (comme nous l'avons vérifié par marquage de l'actine et par microscopie électronique), nous avons donc développé un modèle de culture de cellules d'organoïdes en monocouche constituant un modèle simple d'accès aux pôles apical et basal des cellules. Ce modèle avait été décrit chez le porc dans des études précédentes (***Chapitre 3, Tableau 3***). Cependant, lorsque nous avons tenté de reproduire le protocole de van der Hee et al. (2018) en utilisant le milieu de culture IntestiCult™ OGM, nous avons rencontré d'importantes difficultés pour obtenir des tapis confluent de manière reproductible. De plus, nous avons observé que l'obtention de monocouche d'organoïdes de côlon était moins reproductible que pour le jéjunum. Par ailleurs, les études existantes utilisaient des protocoles différents pour le coating des puits (Matrigel® vs collagène), le nombre de cellules ensemencées et le milieu de culture utilisé (milieu conditionné vs IntestiCult™ OGM) ce qui rendait difficile l'identification des éléments importants pour la réussite du protocole. Ceci met en évidence la nécessité d'harmoniser les protocoles de culture de cellules d'organoïdes d'intestin de porc en monocouche et d'en avoir une description détaillée. L'objectif de cette deuxième partie de la thèse était donc de proposer un protocole détaillé pour permettre d'obtention de tapis cellulaire à partir d'organoïdes de porc de manière reproductible (***Article 2***). La vidéo associée à cet article permet d'illustrer le protocole pour faciliter son réemploi par d'autres expérimentateurs. Dans cette partie seront discutés dans un premier temps la mise au point de ce protocole et les caractéristiques du modèle avant de commenter son utilisation pour induire une dysfonction de la barrière épithéliale.

Mise au point et caractérisation du modèle de monocouches de cellules d'organoïdes

Les points clés du protocole qui ont permis d'obtenir des monocouches de manière reproductible sont (i) l'étape de recouvrement (« coating ») des inserts de culture avec du collagène ; (ii) la dissociation des organoïdes en cellules isolées permettant de contrôler le nombre de cellules ensemencées ; et (iii) l'utilisation d'une concentration élevée de SVF dans le milieu de culture.

L'**étape de coating** des inserts de culture est nécessaire avant l'ensemencement pour permettre l'attachement des cellules tout en empêchant leur croissance en 3D. Nous avons testé deux types de matrice pour recouvrir la membrane des inserts : du Matrigel® et du collagène de type IV, principale protéine structurelle présente dans la matrice extracellulaire (MEC) *in vivo* (*Pompili et al., 2021*). Contrairement au Matrigel® dont la composition peut varier entre les lots de fabrication, le collagène de type IV est composé d'une seule protéine purifiée dont la concentration est déterminée ce qui nous a permis de standardiser la concentration de collagène utilisé (à 50 µg/mL). Bien que, contrairement au Matrigel, le collagène ne représente pas la complexité de la MEC, il suffit à l'attachement des cellules et au développement rapide de monocouches. De plus, nous avons obtenu un développement des monocouches plus reproductibles avec le collagène qu'avec le Matrigel®.

La **dissociation** des organoïdes en **cellules isolées** est également un point important pour l'obtention de monocouches car, contrairement à la dissociation en fragments, cette méthode permet de compter les cellules ce qui permet de standardiser la concentration de cellules pour l'ensemencement. Les études existantes utilisant cette technique chez le porc ont utilisé des concentrations de cellules ensemencées très variées (***Chapitre 3, Tableau 3***). Lors de la mise au point du modèle, nous avons obtenus des monocouches de manière reproductible en ensemençant $2{,}5.10^5$ cellules par insert. Cette concentration est élevée par rapport au reste de la littérature mais nous a permis d'obtenir des tapis confluent après 24 heures de culture tandis que la confluence n'est pas toujours atteinte dans les études existantes (***Chapitre 3, Tableau 3***). Une limite de notre méthode est qu'il faut produire une grande quantité d'organoïdes en 3D pour ensemencer les inserts (il faut compter environ 2 dômes de 50 µL de Matrigel® ensemencées avec 3 000 cellules au départ pour 1 insert de culture).

La composition du **milieu de culture** s'est aussi avérée être un point clé pour l'obtention de monocouches à partir des cellules d'organoïdes de porc. Nous avons initialement essayé de cultiver les monocouches avec du milieu IntestiCult™ OGM non supplémenté, comme décrit dans certaines études de la littérature (***Chapitre 3, Tableau 3***). Cependant nous n'avons pas obtenu de monocouches confluentes dans ces conditions. Un article récent décrivant un modèle de monocouche de cellules d'organoïdes intestinaux chez le bovin a montré que le milieu IntestiCult™ OGM devait être supplémenté avec du SVF (20 %) pour obtenir des monocouches confluentes (*Sutton et al., 2022*). De plus, les études utilisant des protéines purifiées ou des milieux conditionnés pour la culture des monocouches d'organoïdes intestinaux de porc contiennent généralement une concentration élevée de SVF ou des composés de remplacements du SVF (B27, N2 et EGF) (***Chapitre 3, Tableau 3***) (*van der Hee et al., 2018; Hoffmann et al., 2021; Holthaus et al., 2021*). En effet, nous avons constaté que cultiver les cellules avec de l'IntestiCult™ OGM supplémenté avec 20 % SVF permettait d'obtenir des monocouches confluentes après 24 heures de culture. Cette nécessité de supplémenter le milieu en SVF reflète probablement un besoin plus élevé en facteurs nécessaires pour la prolifération et la survie des cellules en monocouche par rapport aux organoïdes 3D. Ces différences pourraient être dues aux facteurs de croissance apportés par le Matrigel® qui ne sont pas présents dans le système d'inserts.

La culture des cellules sur insert permet de mesurer la TEER pour évaluer la confluence et la perméabilité des tapis cellulaires, constituant un indicateur de la fonction de barrière de l'épithélium intestinal (*Srinivasan et al., 2015*). Nous avons observé une augmentation très rapide de la TEER dans les premières 24 à 48 heures suivant l'ensemencement des cellules (entre 1 000 et 2 500 $\Omega.cm^2$) (***Article 2***) reflétant probablement la mise en place des monocouches associée à une prolifération rapide et à la mise en place des jonctions serrées rendant les tapis relativement imperméables. Après 48 heures de culture la TEER diminuait puis semblait se stabiliser, suggérant qu'un état d'équilibre pourrait être atteint. Il serait intéressant de vérifier l'évolution de la TEER sur le long-terme dans notre modèle de monocouche. Les mesures de TEER réalisées dans d'autres études chez le porc ont montré une augmentation plus lente des TEER suivie d'un plateau, avec des valeurs de TEER inférieures aux

nôtres (environ 2 à 4 fois inférieure) (*van der Hee et al., 2018; Hoffmann et al., 2021; Holthaus et al., 2021*). En revanche, d'autres études sur des monocouches de cellules d'organoïdes de duodénum humain et de côlon murin montrent une augmentation lente de la TEER mais avec des valeurs similaires à nos données après 5 jours de culture (> 1 000 Ω.cm²) (*Kozuka et al., 2017; Freire et al., 2019*). Cependant, il est difficile de comparer les valeurs de TEER en fonction du temps entre les études car le nombre de cellules ensemencées est variable. De manière générale, il semblerait que la TEER évolue plus lentement lorsqu'un plus faible nombre de cellules est ensemencées probablement en raison d'une phase de prolifération des cellules pour atteindre la confluence, ce qui n'est pas nécessaire dans nos conditions utilisant un nombre important de cellules. En effet, une étude sur des monocouches de cellules d'organoïdes d'iléon de bovins a montré des TEER inférieures aux nôtres mais plus stables dans le temps en utilisant une plus faible quantité de cellules ensemencées (*Sutton et al., 2022*). Il serait donc intéressant de caractériser l'évolution de la TEER sur le long-terme dans notre modèle de monocouche avec des concentrations de cellules ensemencées plus faible. Les valeurs de TEER obtenues sur nos monocouches dérivées d'organoïdes de jéjunum sont semblables à celles mesurées sur les lignées cellulaires porcines IPEC-1 et IPECJ-2 (*Nossol et al., 2011*), cependant les mesures réalisées *ex vivo* en chambre de Ussing sur de la muqueuse intestinale porcine sont largement inférieures (entre 30 et 100 Ω.cm²) (*Boudry et al., 2004; Moeser et al., 2007a; Smith et al., 2010; Ghiselli et al., 2021*). Ces différences de TEER soulèvent la question de la pertinence physiologique à l'égard de la perméabilité des différents modèles d'étude *in vitro* de l'épithélium intestinal.

Nous avons observé que les organoïdes 3D expriment plus fortement les gènes marqueurs de la prolifération (*PCNA* et *MKI67, SMOC2*) et des marqueurs des cellules sécrétoires (tels que *MUC2*, *SPDEF, TFF3*), tandis que les monocouches expriment plus fortement des gènes marqueurs des cellules absorbantes (tels que *GLUT2, VIL1, KRT20, DPP4 ou ALPI*) (***données complémentaires de l'article 2***). Ces résultats suggèrent qu'une diversité cellulaire plus importante dans les organoïdes 3D pourrait être favorisée par l'organisation en 3D des cellules. La supplémentation du milieu de culture avec du DAPT permettant d'inhiber la voie de signalisation Notch pourrait renforcer la diversité cellulaire et notamment la présence de cellules de la lignée sécrétoire dans les monocouches d'organoïdes intestinaux de porc (*Moon et al., 2014*). Des données obtenues récemment au laboratoire, à l'aide d'un marquage des cellules en prolifération en microscopie confocale (test Edu), ont confirmé que très peu de cellules prolifèrent dans notre modèle de monocouches de cellules d'organoïdes de porc 72h après ensemencement (données non présentées). Les résultats obtenus dans ce modèle doivent donc être interprétées en prenant en compte cet enrichissement en cellules absorbantes. La composition cellulaire de notre modèle de monocouche est donc relativement simple et limitée aux cellules épithéliales. Il serait possible de complexifier le modèle par de la co-culture en incluant au pôle basal des cellules immunitaires présente *in vivo* au niveau de la *lamina propria* (*Noel et al., 2017*). La co-culture avec des bactéries du microbiote serait également très intéressante mais nécessiterait d'établir l'anaérobiose au pôle apical ou d'utiliser des bactéries anaérobies facultatives. Ce type de culture présente néanmoins un risque important de prolifération bactérienne pouvant compromettre la viabilité des cellules épithéliales (*Han et al., 2021*).

Développement d'un modèle de dysfonction de la barrière épithéliale

Après avoir établi notre protocole de culture de monocouche de cellules d'organoïdes d'intestin de porcelet, nous avons cherché à induire une dysfonction de la barrière épithéliale dans ce modèle. Ce travail a été réalisé avec l'objectif initial de mimer les perturbations de l'homéostasie intestinale observées après le sevrage chez le porcelet. *In vivo*, la dysfonction de la barrière de l'épithélium intestinal résultant du sevrage est notamment caractérisée par une augmentation de la perméabilité paracellulaire via des modifications au niveau des jonctions serrées, une réduction de la production de mucus et une activation des réponses inflammatoires et du stress oxydant (*Moeser et al., 2017*). A notre connaissance, il n'existe pas de modèle de dysfonction de la barrière épithéliale mimant ces

perturbations liées au sevrage en utilisant les organoïdes intestinaux de porc. Nous avons donc testé différentes méthodes pour tenter de reproduire certaines des caractéristiques de la dysfonction de la barrière épithéliale observée après le sevrage en utilisant notre modèle de monocouche d'organoïdes de jéjunum de porcelets allaités (***Article 3***).

Nous avons commencé par tester les effets de bactéries (***Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium,*** *résultats non présentés)* impliquées dans les infections entériques fréquemment observées après le sevrage (*Moeser et al., 2017*). Nous avons utilisé ces bactéries sous forme inactivée par la chaleur de manière à empêcher leur prolifération tout en permettant leur manipulation sans contrainte de biosécurité (sans nécessiter un laboratoire L2). Nous n'avons observé aucun effet de ces bactéries *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* (à 1.10^8 cellules/mL) sur la TEER ni sur l'expression de gènes (évalué seulement pour *E. coli)*. Dans notre modèle, ces bactéries inactivées ne semblent donc pas activer les voies de signalisation impliquées dans la reconnaissance des micro-organismes, tel que les TLR qui sont pourtant exprimés dans notre modèle. Cependant, nous n'avons pas vérifié que ces récepteurs sont exprimés au pôle apical des cellules. De plus, la présence probable de mucus à la surface des monocouches de cellules pourrait limiter leur exposition aux composés bactériens. Des techniques d'imagerie pourraient être utilisées pour vérifier ces deux hypothèses. L'utilisation de bactéries vivantes dans notre modèle permettrait peut-être d'obtenir une dysfonction de la barrière épithéliale, cependant les antibiotiques du milieu de culture devrait être retiré et le risque de contaminations serait augmenté. Afin de limiter les contaminations des cultures des monocouches d'organoïdes, il serait intéressant de tester l'effet de surnageants (solutions stériles) issues de contenu intestinaux ou fécaux de porcelets atteints de diarrhées post-sevrage représentant l'environnement de l'épithélium intestinal inflammé.

Dans un second temps, nous avons traité des monocouches de cellules d'organoïdes de jéjunum avec du **peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)** pendant 24 heures afin de mimer le stress oxydant observé après le sevrage chez le porcelet (*Yin et al., 2014; Cao et al., 2018*). Nous avons constaté une destruction des monocouches de cellules d'organoïdes quel que soit la dose testée (100, 400, 800 et 1000 µM). Au contraire, une étude sur la lignée cellulaire IPEC-J2 avait montré une diminution de la TEER en présence de H_2O_2 de manière dose dépendante (*Vergauwen et al., 2015*). Cependant, nous avons traité les monocouches de cellules d'organoïdes pendant 24 heures, contrairement aux études sur les lignées cellulaires qui traitent les cellules pendant quelques heures avec des effets importants sur la TEER (*Oshima et al., 2007; Vergauwen et al., 2015*). Le temps d'incubation des cellules avec de l'H_2O_2 était donc probablement trop long pour observer une diminution de la TEER sans destruction des monocouches. Il serait donc intéressant d'évaluer l'effet du traitement sur les monocouches de cellules d'organoïdes de porc sur un temps plus court.

Nous avons également testé l'effet d'un **cocktail de cytokines pro-inflammatoires** recombinantes humaines (TNF-α, IL1-β, IL-6, 50 ng/mL) afin de mimer l'activation des réponses inflammatoires observées après le sevrage. Ce cocktail de cytokines n'a pas permis de déstabiliser les monocouches et n'a pas eu d'effet sur la TEER. De plus, seule l'expression du gène *CCL20* a été augmentée en présence des cytokines. De nombreuses études ont pourtant décrit une augmentation de la perméabilité, une diminution de l'expression des gènes des jonctions serrées telles que l'occludine et la claudine 1, et une induction de l'apoptose dans différents modèles dont les organoïdes intestinaux humains (*Lechuga et al., 2023*), mais à notre connaissance aucune étude chez le porc n'a été décrite. Récemment, un article sur des organoïdes d'intestin grêle de bovins a également montré une augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale et une induction de l'apoptose après un traitement avec des cytokines (*Crawford et al., 2022*). Cependant, les auteurs ont utilisé des cytokines recombinantes bovines tandis que nous avons utilisé des cytokines recombinantes humaines pour traiter des monocouches d'organoïdes de porcs. Il serait donc intéressant de tester l'effet d'un autre cocktail de cytokines recombinantes porcines (*exemple :* TNF-α, IFN-γ, IL1) sur notre modèle.

Enfin, nous avons traité les monocouches de cellules d'organoïdes d'intestin de porcelet avec la **mycotoxine DON** pouvant être présente dans les céréales ingérées par les porcelets après le sevrage (*Pinton and Oswald, 2014*). Nous avons testé différentes concentrations du DON (1, 5, 10, 50 et 100 µM) mais seul le traitement avec 100 µM de DON a entrainé une dysfonction de la barrière épithéliale avec une augmentation de la perméabilité des monocouches comme décrit dans la littérature dans d'autres modèles de l'épithélium intestinal (*Pinton and Oswald, 2014; Ghareeb et al., 2015*). La concentration de DON utilisée étant élevée, nous avons réalisé des mesures de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH), classiquement utilisé pour mesurer la cytotoxicité. Ces mesures n'ont pas indiqué de toxicité du DON quel que soit la concentration utilisée. Les cellules d'organoïdes d'intestin de porc semblent donc particulièrement résistantes à cette mycotoxine en comparaison des données obtenues dans la littérature avec d'autres modèles. La nécessité d'utiliser une concentration aussi élevée de DON remet en question la pertinence physiologique de cette approche dans la mesure où les quantités d'aliments ingérées par les porcelets dans la semaine qui suit le sevrage sont faibles et que les niveaux de contamination de l'aliment sont probablement insuffisantes pour atteindre une concentration de 100 µM au niveau des cellules épithéliales (*Pinton and Oswald, 2014*). Cependant, il est intéressant de constater que le DON a permis de reproduire *in vitro* beaucoup des dysfonctions de la barrière épithéliale observée *in vivo* après le sevrage. En effet, le DON a réduit la TEER, augmenté l'expression des gènes de jonctions serrées (*TJP1*, *TJP3*, *OCLN*), diminué l'expression des gènes marqueurs de types cellulaires matures de l'épithélium intestinal (*CA2*, *CHGA*, *LYZ*, *MUC2*) et modulé l'expression de gènes impliqués dans les réponses immunitaires innées (*TLR4*, *CCL5*, *CCL20*). De plus, le DON a fortement augmenté l'expression de marqueurs de prolifération (*MKI67, PNCA, HES1*) ce qui suggère la mise en place de mécanismes de réparation de l'épithélium. L'augmentation très marquée de l'expression du gène *HES1* indique une activation de la voie de signalisation Notch en présence de DON comme suggérée récemment sur des cellules IPEC-J2 (*Xiao et al., 2022*). Il serait donc intéressant d'inhiber la voie Notch avec du DAPT pour tester si cette approche pourrait prévenir les effets du DON sur les monocouches d'organoïdes de porc.

Globalement, l'induction d'une dysfonction de la barrière épithéliale dans notre modèle de monocouche de cellules épithéliales s'est avérée plus difficile que prévue. Cette « résistance » des cellules d'organoïdes est en accord avec la TEER élevée indiquant la présence de cellules très jointives. Bien que l'utilisation de DON en concentration élevée ne soit pas directement représentative du sevrage chez le porcelet, cette méthode est la seule à nous avoir permis d'induire efficacement une dysfonction de la barrière épithéliale.

III – Utilisation du modèle de monocouches de cellules d'organoïdes pour tester des produits nutritionnels dérivés de micro-organismes

Dans la dernière partie de la thèse, nous avons utilisé le modèle des monocouches de cellules d'organoïdes de jéjunum de porcelets pour tester les effets de trois produits dérivés de micro-organismes (butyrate, YANG, *L. helveticus*) sur l'épithélium (***Article 3***). Pour prendre en compte la variabilité inter-individuelle, nous avons traité des monocouches de cellules issues d'organoïdes provenant de plusieurs porcelets allaités (n = 5-7 selon les expériences). Une analyse en composante principale de l'expression de gènes a montré une variabilité inter-individuelle très importante, nettement plus marquée que l'effet des traitements (***Figure 53***). En conséquence, nous avons exprimé tous nos résultats relativement au témoin négatif (cellules traitées par le PBS) du même individu et nous avons utilisé des modèles statistiques permettant de corriger cette variabilité inter-individuelle (modèle linéaire mixte incluant le porcelet comme effet aléatoire). Ces observations soulèvent l'importance de réaliser les expériences sur des cellules issues d'organoïdes de plusieurs individus pour obtenir des résultats généralisables et non spécifiques d'un seul porcelet. Les mécanismes expliquant ces différences interindividuelles restent à explorer et il serait par exemple intéressant de comprendre si ces spécificités *in vivo* peuvent être liées au microbiote ou à l'état de santé du porcelet à l'origine

des organoïdes. Au préalable, il faudrait vérifier que ces profils individuels sont stables même lorsque les cellules sont issues d'organoïdes du même porcelet à différents passages ou après congélation/décongélation (réplicats techniques) car dans nos données chaque porcelet a été utilisé une seule fois par condition.

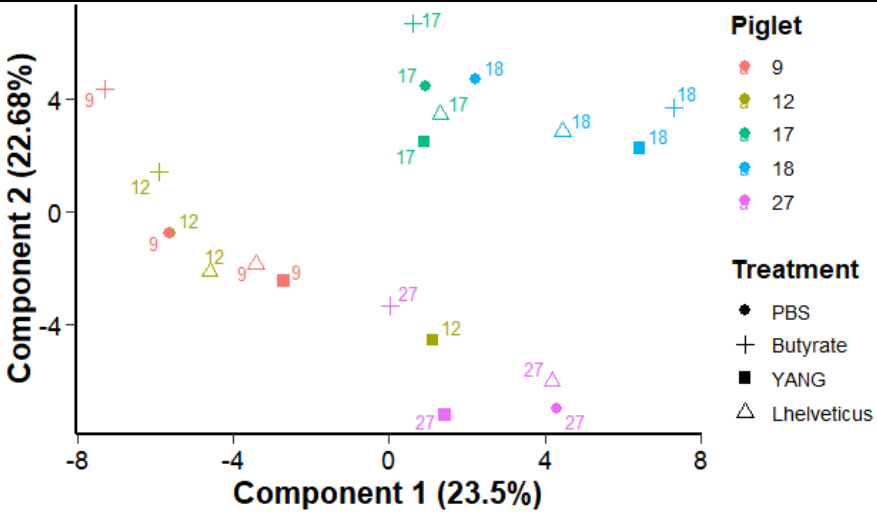


FIGURE 53 : ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE DE L'EXPRESSION DE GENES DANS LES MONOCOUCHES DE CELLULES ORGANOÏDES DE JEJUNUM DE PORCELETS

Analyse en composante principale de l'expression de 81 gènes dans les monocouches de cellules d'organoïdes d'intestin de porcelets traités par du PBS, du Butyrate, YANG ou L. *Helveticus* comme décrit dans l'expérience 1 de l'article 3. Les échantillons sont colorés par porcelet (n = 5). Les symboles représentent les traitements.

Bien que les profils d'expression de gènes soient très fortement influencés par le porcelet à l'origine des organoïdes (***Figure 53***), nous avons observé des effets marqués du butyrate sur les monocouches de cellules d'organoïdes. Ces résultats sont originaux sur des cellules d'organoïdes de porc et les effets du butyrate que nous avons observé sur la fonction de barrière et la différenciation épithéliale sont en accord avec les données obtenues sur les lignées cellulaires Caco-2 et IPEC-J2 (*Peng et al., 2009; Yan and Ajuwon, 2017*). Cependant, nous avons observé que le butyrate réduit la prolifération lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu mimant l'environnement des cellules souches alors que l'inverse est observé lorsque les facteurs souches sont absents au pôle apical. Nous pensons que ces résultats pourraient s'expliquer par le paradoxe du butyrate qui propose que les cellules absorbantes différenciées utilisent le butyrate comme source d'énergie, tandis que les cellules souches/en prolifération utiliseraient le glucose laissant ainsi le butyrate exercer son rôle d'inhibiteur des HDAC (*Salvi and Cowles, 2021*). La présence de plusieurs types cellulaires dans notre modèle de monocouches de cellules d'organoïdes permettrait d'explorer ces mécanismes, ce qui ne serait pas possible avec des lignées cellulaires ne comprenant pas de diversité cellulaire. Il s'agit de l'un des principaux avantages de ce modèle de monocouches de cellules d'organoïdes (***Tableau 5***). Pour vérifier notre hypothèse liée au paradoxe du butyrate, il serait intéressant de cultiver des monocouches en présence d'inhibiteurs de la β-oxydation ou des HDAC en condition de culture favorisant la différenciation ou la prolifération. En revanche, les monocouches d'organoïdes ne reproduisent pas la micro-architecture 3D des cryptes alors qu'il a été montré que ces structures était importantes pour protéger les cellules souches du butyrate via son oxydation par les cellules différenciées situées en haut des cryptes (*Kaiko et al., 2016*). De plus, nous avons testé le butyrate sur des cellules de jéjunum alors qu'il est produit en quantité plus importante dans le côlon. Contrairement aux cellules du côlon, les substrats majoritaires des cellules épithéliales du jéjunum sont le glucose et la glutamine. Il pourrait donc être intéressant de comparer les effets du butyrate en fonction du segment digestif constituant un autre intérêt majeur du modèle des organoïdes par rapport aux lignées cellulaires (***Tableau 5***). Ce type d'approche a déjà été utilisé dans d'autres études avec des monocouches de cellules d'organoïdes

intestinaux de porcs pour étudier le tropisme régional de micro-organismes infectieux (*Li et al., 2019a; Yin et al., 2020*). Les monocouches d'organoïdes pourraient donc être utilisées afin de tester les effets de produits dérivés de micro-organismes de manière spécifique du segment en utilisant différents individus donneurs permettant de prendre en compte la variabilité inter-individuelle, ce qui n'est pas possible avec les lignées cellulaires (***Tableau 5***). Cependant, un avantage important des lignées cellulaires est qu'elles sont plus simples à cultiver et leur coût est nettement plus faible.

TABLEAU 5 : AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES LIGNEES CELLULAIRES ET DES ORGANOÏDES D'INTESTIN DE PORC POUR TESTER DES PRODUITS NUTRITIONNELS

	Lignée cellulaire	Organoïdes 3D	Monocouche de cellules d'organoïdes
Facilité de culture	+++	+	-
Temps de culture	-	+	++
Coût	-	++	+++
Anomalies génétiques	+	-	-
Disponibilité par segment intestinal	-	+	+
Maintien de l'identité régionale	-	+	+
Micro architecture 3D	-	+	-
Diversité cellulaire	-	++	+
Variabilité inter-individuelle	-	+	+
Facilité d'accès au pôle apical des cellules	+	-	+
Etude de la fonction de barrière	+	-	+

En parallèle du butyrate, nous avons également testé les effets de deux postbiotiques YANG et *L. helveticus* de l'entreprise Lallemand. Nous avons observé relativement peu d'effets des produits testés et ces effets semblent dépendre fortement des conditions de culture utilisées. Ces données restent préliminaires et il faudrait tester ces postbiotiques à d'autres concentrations, pendant des durées plus longues et sur d'autres segments intestinaux. D'un point de vue pratique, la culture des organoïdes et des monocouches a duré 3 mois pour tester trois produits dérivés de micro-organismes (Butyrate, YANG et *L. helveticus*) dans 2 conditions différentes (avec ou sans challenge) sur 7 porcelets. Cette expérience a également eu un coût élevé en raison de l'utilisation du milieu IntestiCult™ OGM et du Matrigel®. Cette technique de culture semble donc peu envisageable pour le crible à haut débit de nouveaux produits. Cette étape préliminaire pourrait être réalisée sur d'autres modèles *in vitro* moins couteux comme les lignées cellulaires IPEC-J2. Les résultats des postbiotiques les plus intéressants pourraient ensuite être confirmés sur le modèle des monocouches d'organoïdes de manière spécifique du segment digestif d'intérêt et en prenant en compte la variabilité inter-individuelle. L'étape de tests sur organoïdes pourrait être particulièrement adaptée pour étudier les modes d'actions des produits, notamment en ce qui concerne l'implication de divers types de cellules épithéliales.

Le modèle de monocouches de cellules d'organoïdes d'intestin de porcelet mimant une dysfonction de la barrière que nous avons développé semble donc pertinent pour mettre en évidence les effets de produits dérivés de micro-organismes sur l'épithélium, comme nous l'avons montré avec le butyrate. Malgré ses nombreux avantages (diversité cellulaire, maintien de l'identité du segment digestif et de la diversité inter-individuelle), ce modèle présente des limites liées à son coût et au débit d'analyse relativement faible en comparaison des lignées cellulaires classiquement utilisées. Nous proposons donc d'intégrer l'utilisation des organoïdes intestinaux de porc à une chaîne d'expériences, en aval des criblages sur lignées cellulaires et en amont des expérimentations *in vivo,* pour identifier de nouveaux postbiotiques permettant de renforcer la fonction de barrière de l'épithélium intestinal chez le porcelet.

Perspectives

D'importants progrès méthodologiques ont été atteints au cours de cette thèse pour maitriser de manière reproductible la culture des organoïdes d'intestin de porcelet en 3D et en 2D. Ces modèles restent néanmoins perfectibles et ce travail ouvre de nombreuses perspectives d'amélioration, notamment pour mieux caractériser le phénotype des organoïdes et pour les complexifier. Quelques exemples sont proposés ci-dessous.

Quelle est la composition cellulaire des organoïdes d'intestin de porc ?

Nos données d'expression des gènes suggèrent que les organoïdes d'intestin de porcs sont constitués des différents types cellulaires présent au sein de l'épithélium intestinal *in vivo*, comme décrit précédemment (*Gonzalez et al., 2013; van der Hee et al., 2018*). Cependant, nos analyses en microscopie confocale et électronique laissent penser que, dans nos conditions, les organoïdes sont composés majoritairement de cellules en prolifération et de cellules absorbantes tandis que la présence des cellules sécrétoires, telles que les cellules en gobelet, semble nettement plus rare. De plus, nous n'avons pas observé de cellules entéroendocrines ni de cellules de Paneth par imagerie, probablement en raison de la rareté de ces cellules mais aussi de par le manque d'anticorps validés au laboratoire pour les détecter. L'inhibition de la voie Notch dans les organoïdes avec du DAPT pourrait favoriser la différenciation des organoïdes intestinaux et diminuer la proportion des cellules en prolifération (*Moon et al., 2014; VanDussen et al., 2015*). En effet, une étude récente a montré que l'utilisation de DAPT dans le milieu de culture des organoïdes 3D d'intestin grêle de porc (duodénum, jéjunum et iléon) a diminué l'expression des gènes marqueurs des cellules souches *LGR5* et *AXIN2* tandis que le DAPT a augmenté l'expression des gènes marqueurs la lignée sécrétoire, tel que *ATOH1*, *NEUROG3*, *GHGA*, *MUC2* et *TFF3* (*Zhang et al., 2022*).

L'analyse du transcriptome des organoïdes d'intestin de porcelet par séquençage de l'ARN en cellule unique (« single cell RNA-seq ») permettrait d'identifier plus précisément les types cellulaires présents, leur proportion et l'expression de gènes spécifiques à chaque type cellulaire. La comparaison de ces données avec celles obtenues par la même technologie sur des tissus épithéliaux *in vivo* permettrait de progresser fortement dans la caractérisation des organoïdes intestinaux de porc et serait utile pour évaluer leur pertinence physiologique. Ces données existent déjà *in vivo* (*Tang et al., 2022a*) mais à notre connaissance, aucune étude n'a utilisé le single cell RNA-seq sur des organoïdes intestinaux de porc.

Culture d'organoïdes intestinaux à partir de cellules iPSC de porc

Dans notre étude, les organoïdes ont été cultivés à partir de « cellule souches adultes » (ASC) issues de l'intestin de porcelets. Or, les organoïdes intestinaux peuvent également être dérivés des cellules souches pluripotentes induites (iPSC). Les organoïdes dérivés d'iPSC humaines ont un phénotype considéré relativement immature, se rapprochant des caractéristiques des tissus fœtaux plutôt qu'adulte (*In et al., 2016*). Le développement de la culture d'organoïdes intestinaux à partir d'iPSC porcines pourrait peut-être permettre de mimer *in vitro* un épithélium intestinal en développement pouvant mimer l'intestin immature de porcelets allaités. De plus, les organoïdes intestinaux dérivés d'iPSC contiennent des cellules mésenchymateuses ce qui complexifierait le modèle des organoïdes porcins et pourrait permettre d'apporter des facteurs manquant dans le milieu de culture (*Date and Sato, 2015*). Des protocoles sont désormais disponibles pour cultiver des iPSC porcines (*Gao et al., 2019*) mais les méthodes pour cultiver des organoïdes à partir de ces cellules sont encore peu développées. Seule une étude a montré un résultat préliminaire d'obtention d'un organoïde d'intestin à partir d'iPSC porcines sans détailler les méthodes (*Ma et al., 2022*). Il est également possible d'orienter la différenciation des iPSC vers les différents segments digestifs (*Crespo et al., 2017*). Il serait donc intéressant de comparer la capacité des organoïdes dérivés des iPSC porcines à reproduire l'identité des segments digestifs par rapport aux organoïdes intestinaux dérivés d'ASC porcines.

Modèle de culture de cellules d'organoïdes intestinaux sur supports microstructurés

Notre modèle de culture de monocouche de cellules d'organoïdes d'intestin de porcelet permet d'avoir accès au pôle apical des cellules. Cependant, un inconvénient de ce système de culture est la perte de la micro-architecture de l'épithélium intestinal présente *in vivo* et partiellement reproduite dans les organoïdes cultivés en 3D. De nouveaux modèles microstructurés font leur apparition et permettent la culture de cellules d'organoïdes humains ou murins sur des supports mimant la microstructure 3D de l'épithélium intestinal tout en maintenant l'accès au pôle apical des cellules (*Wang et al., 2018; Sidar et al., 2019; Nikolaev et al., 2020*) (***Figure 54***). Les modèles les plus sophistiqués incluent des gradients biochimiques permettant de mimer les variations de niveaux d'activation des voies de signalisations Wnt et BMP dans l'axe de la crypte (***Figure 54A***). L'utilisation de systèmes microfluidiques (« intestin sur puce ») permet également de mimer les flux présents dans la lumière intestinale (***Figure 54B***). Il serait intéressant de cultiver des cellules d'organoïdes intestinaux de porc à l'aide de ce type de modèle plus proche de l'organisation observée *in vivo*. Cependant, ces techniques restent très complexes et couteuses et nécessiterait une mise au point importante et du matériel adapté. De plus, ces modèles hautement sophistiqués ne semblent pas actuellement adaptés au criblage de produits nutritionnels ciblant la barrière épithéliale du porcelet en raison de leur faible débit d'analyse.

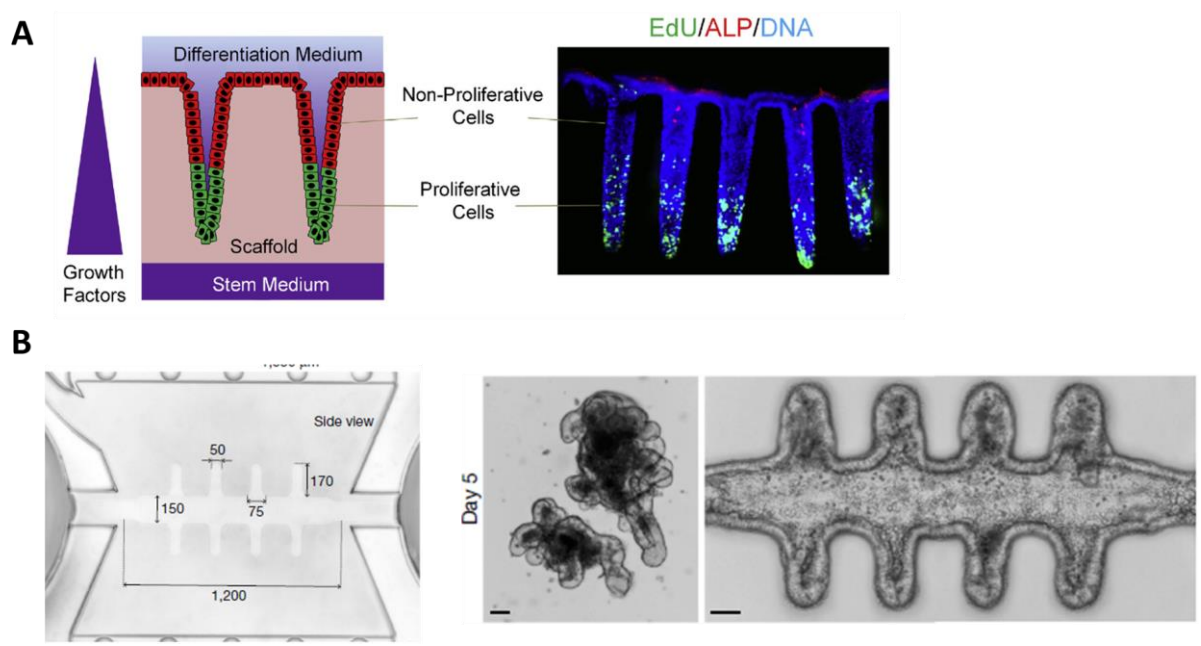


FIGURE 54 : EXEMPLES DE MODELES DE CULTURE DE CELLULES D'ORGANOÏDES SUR DES MICROSTRUCTURES

(A) Des cellules d'organoïdes de côlon humain ont été ensemencées sur une matrice microstructurée pour recréer la géométrie en forme de crypte. Les cellules ont ensuite été cultivées en présence d'un gradient de concentration de facteurs de croissance. Les cryptes ont été observées en microscopie confocale avec un marquage des cellules en prolifération (EdU, vert) et de l'alcaline phosphatase (rouge). Le noyau des cellules est marqué en bleu. Les cellules prolifératives sont localisées à la base des cryptes, tandis que les cellules différenciées sont situées sur la surface luminale recréant une crypte asymétrique avec un compartiment prolifératif et un compartiment différencié. D'après Wang et al. (2018). **(B)** Culture à long terme de mini-intestins tubulaires murins dans un système microfluidique d'intestin sur puce. Un canal central et des invaginations ont été créés dans un compartiment d'hydrogel à l'aide d'un laser. Des cellules d'organoïdes d'intestin murins ont été cultivées dans du Matrigel® (gauche) ou dans le système microstructuré (droite) pendant 5 jours. Le système microstucturé a permis la formation d'un épithélium organisé autour d'un compartiment luminal dans lequel s'écoulent des fluides. D'après Nikolaev et al. (2020)

Conclusion générale

L'objectif de cette thèse était de mettre en place un modèle de culture d'organoïdes d'intestin de porcelets pour tester les effets de postbiotiques ciblant la fonction de barrière de l'épithélium intestinal.

Dans une première partie nous avons **créé une biobanque d'organoïdes** de jéjunum et de côlon de porcelets allaités et sevrés. Nous avons également cryoconservé des cryptes épithéliales de duodénum, jéjunum, iléon et côlon. Collectivement, ce matériel biologique a le potentiel de générer une centaine de lignées d'organoïdes issus de 4 segments digestifs de 24 porcelets allaités ou sevrés. L'utilisation de cette biobanque pour toutes les expériences réalisées au cours de ce travail de thèse et la mise à disposition de procédures standardisées d'utilisation des organoïdes à destination de la communauté scientifique sont des éléments significatifs contribuant à la réduction de l'utilisation des porcelets pour l'expérimentation.

Notre caractérisation des organoïdes de jéjunum et de côlon de porcelets allaités a montré un **maintien partiel de l'identité régionale** du segment digestif *in vitro*. Ce résultat ouvre d'importantes perspectives d'utilisation des organoïdes intestinaux pour étudier l'épithélium intestinal du porcelet de manière spécifique du segment digestif. En revanche, nous avons montré que les organoïdes de jéjunum de porcelets allaités ou sevrés **ne conservent pas les caractéristiques de leur stade de développement autour du sevrage** sur un intervalle de temps de 15 jours. La complexification des conditions de culture en incluant d'autres types cellulaires ou en mimant certains paramètres environnementaux des cellules épithéliales sera nécessaire pour améliorer la capacité des organoïdes de porcelets à mimer les caractéristiques physiologiques des tissus dont ils dérivent.

Une réalisation importante de ce travail de thèse a été de mettre au point un **protocole permettant de cultiver de manière reproductible des monocouches de cellules dérivées des organoïdes intestinaux de porcelets**. Ce système de culture permet un accès direct et simple au pôle apical des cellules épithéliales intestinales, une caractéristique nécessaire pour étudier les effets de composés provenant de la lumière intestinale (nutriments, toxines, microbiote, métabolites, pathogènes, …) sur l'épithélium du porcelet. Nous avons également montré que **la mycotoxine déoxynivalénol pouvait être utilisée pour induire une dysfonction de la barrière épithéliale** dans ce modèle. Ces avancés techniques permettent de disposer de nouveaux outils pour étudier les effets de composés luminaux sur l'épithélium intestinal du porcelet, en condition ou non d'une dysfonction de la barrière, comme observé lors du sevrage. Néanmoins, des optimisations de notre modèle restent à envisager, notamment pour allonger la durée de culture et la stabilité du phénotype au cours du temps ainsi que pour renforcer la diversité des cellules épithéliales présentes dans les monocouches.

Nous avons apporté la preuve de concept que notre modèle de monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets permettait de mettre en évidence les effets du **butyrate**, ce métabolite produit par le microbiote étant décrit pour moduler les fonctions de l'épithélium intestinal. Ce modèle nous a également permis de mettre en évidence quelques effets de **postbiotiques** dérivés de levures (YANG) ou de bactéries (*Lactobacillus helveticus)* sur la barrière épithéliale. Cependant, les résultats divergent en fonction du milieu de culture utilisé, mimant ou non la niche des cellules souches, et interrogent sur le choix des conditions de culture optimales pour obtenir des résultats extrapolables *in vivo*.

Pour conclure, l'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse a donc permis de mieux caractériser et standardiser les techniques de culture des organoïdes intestinaux de porcelets. Le développement d'un modèle reproductible de culture de monocouche de cellules d'organoïdes ouvre d'importantes perspectives pour étudier *in vitro* l'épithélium intestinal du porcelet. Ce nouvel outil pourra notamment contribuer à évaluer l'intérêt de nouveaux produits nutritionnels dont les

postbiotiques ou autres composés qui pourraient, à terme, être utilisés pour renforcer la santé digestive et ainsi limiter l'utilisation des antibiotiques en élevage. De nombreuses autres applications des modèles organoïdes porcins développés dans cette thèse peuvent être envisagés, comme l'étude des interactions de l'épithélium intestinal porcin avec le microbiote. De la même manière ces modèles organoïdes sont particulièrement bien adaptés aux études hôte-pathogènes ciblant l'épithélium digestif porcin. Les développements de ces modèles pourraient ainsi permettre de mieux comprendre les mécanismes d'infection par des virus ou bactéries ciblant les élevages porcins et pourraient permettre de contribuer à combattre l'émergence et la propagation des zoonoses.

Références bibliographiques

A

Abid, R., Waseem, H., Ali, J., Ghazanfar, S., Muhammad Ali, G., Elasbali, A. M., et al. (2022). Probiotic Yeast Saccharomyces: Back to Nature to Improve Human Health. *J Fungi (Basel)* 8, 444. doi: 10.3390/jof8050444.

Aihara, E., Engevik, K. A., and Montrose, M. H. (2017). Trefoil Factor Peptides and Gastrointestinal Function. *Annu Rev Physiol* 79, 357–380. doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105447.

Akbari, P., Braber, S., Varasteh, S., Alizadeh, A., Garssen, J., and Fink-Gremmels, J. (2017). The intestinal barrier as an emerging target in the toxicological assessment of mycotoxins. *Arch Toxicol* 91, 1007–1029. doi: 10.1007/s00204-016-1794-8.

Alassane-Kpembi, I., Pinton, P., Hupé, J.-F., Neves, M., Lippi, Y., Combes, S., et al. (2018). Saccharomyces cerevisiae Boulardii Reduces the Deoxynivalenol-Induced Alteration of the Intestinal Transcriptome. *Toxins* 10, 199. doi: 10.3390/toxins10050199.

Alex, S., Lange, K., Amolo, T., Grinstead, J. S., Haakonsson, A. K., Szalowska, E., et al. (2013). Short-Chain Fatty Acids Stimulate Angiopoietin-Like 4 Synthesis in Human Colon Adenocarcinoma Cells by Activating Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ. *Molecular and Cellular Biology* 33, 1303–1316. doi: 10.1128/MCB.00858-12.

Almeqdadi, M., Mana, M. D., Roper, J., and Yilmaz, Ö. H. (2019). Gut organoids: mini-tissues in culture to study intestinal physiology and disease. *Am J Physiol Cell Physiol* 317, C405–C419. doi: 10.1152/ajpcell.00300.2017.

B

Banerjee, A., McKinley, E. T., Moltke, J. von, Coffey, R. J., and Lau, K. S. (2018). Interpreting heterogeneity in intestinal tuft cell structure and function. *J Clin Invest* 128, 1711–1719. doi: 10.1172/JCI120330.

Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 19–33. doi: 10.1038/nrm3721.

Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449, 1003–1007. doi: 10.1038/nature06196.

Barnett, A. M., Mullaney, J. A., Hendriks, C., Le Borgne, L., McNabb, W. C., and Roy, N. C. (2021). Porcine colonoids and enteroids keep the memory of their origin during regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol* 320, C794–C805. doi: 10.1152/ajpcell.00420.2020.

Barton, M. D. (2014). Impact of antibiotic use in the swine industry. *Current Opinion in Microbiology* 19, 9–15. doi: 10.1016/j.mib.2014.05.017.

Bastide, P., Darido, C., Pannequin, J., Kist, R., Robine, S., Marty-Double, C., et al. (2007). Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. *Journal of Cell Biology* 178, 635–648. doi: 10.1083/jcb.200704152.

Beaumont, M., Blanc, F., Cherbuy, C., Egidy, G., Giuffra, E., Lacroix-Lamandé, S., et al. (2021a). Intestinal organoids in farm animals. *Veterinary Research* 52, 33. doi: 10.1186/s13567-021-00909-x.

Beaumont, M., Cauquil, L., Bertide, A., Ahn, I., Barilly, C., Gil, L., et al. (2021b). Gut Microbiota-Derived Metabolite Signature in Suckling and Weaned Piglets. *J Proteome Res* 20, 982–994. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00745.

Beaumont, M., Paës, C., Mussard, E., Knudsen, C., Cauquil, L., Aymard, P., et al. (2020). Gut microbiota derived metabolites contribute to intestinal barrier maturation at the suckling-to-weaning transition. *Gut Microbes* 11, 1268–1286. doi: 10.1080/19490976.2020.1747335.

Bedard, K., and Krause, K.-H. (2007). The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews* 87, 245–313. doi: 10.1152/physrev.00044.2005.

Bevins, C. L., and Salzman, N. H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 9, 356–368. doi: 10.1038/nrmicro2546.

Böhmer, C., Sopjani, M., Klaus, F., Lindner, R., Laufer, J., Jeyaraj, S., et al. (2010). The Serum and Glucocorticoid Inducible Kinases SGK1-3 Stimulate the Neutral Amino Acid Transporter SLC6A19. *CPB* 25, 723–732. doi: 10.1159/000315092.

Boj, S. F., Vonk, A. M., Statia, M., Su, J., Dekkers, J. F., Vries, R. R. G., et al. (2017). Forskolin-induced Swelling in Intestinal Organoids: An In Vitro Assay for Assessing Drug Response in Cystic Fibrosis Patients. *J Vis Exp*, 55159. doi: 10.3791/55159.

Bond, J. S., Matters, G. L., Banerjee, S., and Dusheck, R. E. (2005). Meprin metalloprotease expression and regulation in kidney, intestine, urinary tract infections and cancer. *FEBS Letters* 579, 3317–3322. doi: 10.1016/j.febslet.2005.03.045.

Boudry, G., Lallès, J. P., Malbert, C. H., Bobillier, E., and Sève, B. (2002). Diet-Related Adaptation of the Small Intestine at Weaning in Pigs Is Functional Rather Than Structural. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 34, 180.

Boudry, G., Péron, V., Le Huërou-Luron, I., Lallès, J. P., and Sève, B. (2004). Weaning Induces Both Transient and Long-Lasting Modifications of Absorptive, Secretory, and Barrier Properties of Piglet Intestine. *The Journal of Nutrition* 134, 2256–2262. doi: 10.1093/jn/134.9.2256.

Bruewer, M., Luegering, A., Kucharzik, T., Parkos, C. A., Madara, J. L., Hopkins, A. M., et al. (2003). Proinflammatory Cytokines Disrupt Epithelial Barrier Function by Apoptosis-Independent Mechanisms 1. *The Journal of Immunology* 171, 6164–6172. doi: 10.4049/jimmunol.171.11.6164.

Bryant, D. M., and Mostov, K. E. (2008). From cells to organs: building polarized tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 887–901. doi: 10.1038/nrm2523.

Burclaff, J., Bliton, R. J., Breau, K. A., Ok, M. T., Gomez-Martinez, I., Ranek, J. S., et al. (2022). A Proximal-to-Distal Survey of Healthy Adult Human Small Intestine and Colon Epithelium by Single-Cell Transcriptomics. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 13, 1554–1589. doi: 10.1016/j.jcmgh.2022.02.007.

C

Campbell, E. L., and Colgan, S. P. (2019). Control and dysregulation of redox signalling in the gastrointestinal tract. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16, 106–120. doi: 10.1038/s41575-018-0079-5.

Cao, S. T., Wang, C. C., Wu, H., Zhang, Q. H., Jiao, L. F., and Hu, C. H. (2018). Weaning disrupts intestinal antioxidant status, impairs intestinal barrier and mitochondrial function, and triggers mitophagy in piglets1. *Journal of Animal Science* 96, 1073–1083. doi: 10.1093/jas/skx062.

Carmon, K. S., Gong, X., Lin, Q., Thomas, A., and Liu, Q. (2011). R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 11452–11457. doi: 10.1073/pnas.1106083108.

Chen, T., Long, W., Zhang, C., Liu, S., Zhao, L., and Hamaker, B. R. (2017a). Fiber-utilizing capacity varies in Prevotella- versus Bacteroides-dominated gut microbiota. *Sci Rep* 7, 2594. doi: 10.1038/s41598-017-02995-4.

Chen, Y., Zhou, W., Roh, T., Estes, M. K., and Kaplan, D. L. (2017b). In vitro enteroid-derived three-dimensional tissue model of human small intestinal epithelium with innate immune responses. *PLOS ONE* 12, e0187880. doi: 10.1371/journal.pone.0187880.

Cheng, H., and Leblond, C. P. (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. *American Journal of Anatomy* 141, 537–561. doi: 10.1002/aja.1001410407.

Choudhury, R., Middelkoop, A., Boekhorst, J., Gerrits, W. J. J., Kemp, B., Bolhuis, J. E., et al. (2021). Early life feeding accelerates gut microbiome maturation and suppresses acute post-weaning stress in piglets. *Environmental Microbiology* 23, 7201–7213. doi: 10.1111/1462-2920.15791.

Clevers, H. (2013). The Intestinal Crypt, A Prototype Stem Cell Compartment. *Cell* 154, 274–284. doi: 10.1016/j.cell.2013.07.004.

Co, J. Y., Margalef-Català, M., Li, X., Mah, A. T., Kuo, C. J., Monack, D. M., et al. (2019). Controlling Epithelial Polarity: A Human Enteroid Model for Host-Pathogen Interactions. *Cell Reports* 26, 2509-2520.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.108.

Comelli, E. M., Lariani, S., Zwahlen, M.-C., Fotopoulos, G., Holzwarth, J. A., Cherbut, C., et al. (2009). Biomarkers of human gastrointestinal tract regions. *Mamm Genome* 20, 516–527. doi: 10.1007/s00335-009-9212-7.

Costa, J., and Ahluwalia, A. (2019). Advances and Current Challenges in Intestinal in vitro Model Engineering: A Digest. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7. Available at: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2019.00144 [Accessed January 14, 2022].

Crawford, C. K., Lopez Cervantes, V., Quilici, M. L., Armién, A. G., Questa, M., Matloob, M. S., et al. (2022). Inflammatory cytokines directly disrupt the bovine intestinal epithelial barrier. *Sci Rep* 12, 14578. doi: 10.1038/s41598-022-18771-y.

Crespo, M., Vilar, E., Tsai, S.-Y., Chang, K., Amin, S., Srinivasan, T., et al. (2017). Colonic Organoids Derived from Human Pluripotent Stem Cells for Modeling Colorectal Cancer and Drug Testing. *Nat Med* 23, 878–884. doi: 10.1038/nm.4355.

Curtis, J., and Bourne, F. J. (1971). Immunoglobulin quantitation in sow serum, colostrum and milk and the serum of young pigs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 236, 319–332. doi: 10.1016/0005-2795(71)90181-4.

Czerucka, D., Dahan, S., Mograbi, B., Rossi, B., and Rampal, P. (2000). Saccharomyces boulardii Preserves the Barrier Function and Modulates the Signal Transduction Pathway Induced in

Enteropathogenic Escherichia coli-Infected T84 Cells. *Infection and Immunity* 68, 5998–6004. doi: 10.1128/IAI.68.10.5998-6004.2000.

D

d'Aldebert, E., Quaranta, M., Sébert, M., Bonnet, D., Kirzin, S., Portier, G., et al. (2020). Characterization of Human Colon Organoids From Inflammatory Bowel Disease Patients. *Front Cell Dev Biol* 8, 363. doi: 10.3389/fcell.2020.00363.

Daly, K., and Shirazi-Beechey, S. P. (2006). Microarray Analysis of Butyrate Regulated Genes in Colonic Epithelial Cells. *DNA and Cell Biology* 25, 49–62. doi: 10.1089/dna.2006.25.49.

Date, S., and Sato, T. (2015). Mini-Gut Organoids: Reconstitution of the Stem Cell Niche. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 31, 269–289. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100814-125218.

Daudelin, J.-F., Lessard, M., Beaudoin, F., Nadeau, É., Bissonnette, N., Boutin, Y., et al. (2011). Administration of probiotics influences F4 (K88)-positive enterotoxigenic Escherichia coli attachment and intestinal cytokine expression in weaned pigs. *Veterinary Research* 42, 69. doi: 10.1186/1297-9716-42-69.

Davie, J. R. (2003). Inhibition of Histone Deacetylase Activity by Butyrate. *The Journal of Nutrition* 133, 2485S-2493S. doi: 10.1093/jn/133.7.2485S.

de Aguiar Vallim, T. Q., Tarling, E. J., and Edwards, P. A. (2013). Pleiotropic Roles of Bile Acids in Metabolism. *Cell Metabolism* 17, 657–669. doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.013.

Dekkers, J. F., Wiegerinck, C. L., de Jonge, H. R., Bronsveld, I., Janssens, H. M., de Winter-de Groot, K. M., et al. (2013). A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nat Med* 19, 939–945. doi: 10.1038/nm.3201.

Derricott, H., Luu, L., Fong, W. Y., Hartley, C. S., Johnston, L. J., Armstrong, S. D., et al. (2019). Developing a 3D intestinal epithelium model for livestock species. *Cell Tissue Res.* 375, 409–424. doi: 10.1007/s00441-018-2924-9.

Do, T. T. H., Hindlet, P., Waligora-Dupriet, A.-J., Kapel, N., Neveux, N., Mignon, V., et al. (2014). Disturbed intestinal nitrogen homeostasis in a mouse model of high-fat diet-induced obesity and glucose intolerance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 306, E668–E680. doi: 10.1152/ajpendo.00437.2013.

Dogterom, M., and Koenderink, G. H. (2019). Actin–microtubule crosstalk in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 38–54. doi: 10.1038/s41580-018-0067-1.

Donaldson, G. P., Lee, S. M., and Mazmanian, S. K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol* 14, 20–32. doi: 10.1038/nrmicro3552.

Dotti, I., Mora-Buch, R., Ferrer-Picón, E., Planell, N., Jung, P., Masamunt, M. C., et al. (2017). Alterations in the epithelial stem cell compartment could contribute to permanent changes in the mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut* 66, 2069–2079. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312609.

Dunsford, B. R., Haensly, W. E., and Knabe, D. A. (1991). Effects of diet on acidic and neutral goblet cell populations in the small intestine of early weaned pigs. *Am J Vet Res* 52, 1743–1746.

Dutton, J. S., Hinman, S. S., Kim, R., Wang, Y., and Allbritton, N. L. (2019). Primary Cell-Derived Intestinal Models: Recapitulating Physiology. *Trends in Biotechnology* 37, 744–760. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.12.001.

E

Elmentaite, R., Kumasaka, N., Roberts, K., Fleming, A., Dann, E., King, H. W., et al. (2021). Cells of the human intestinal tract mapped across space and time. *Nature* 597, 250–255. doi: 10.1038/s41586-021-03852-1.

Engelstoft, M. S., Lund, M. L., Grunddal, K. V., Egerod, K. L., Osborne-Lawrence, S., Poulsen, S. S., et al. (2015). Research Resource: A Chromogranin A Reporter for Serotonin and Histamine Secreting Enteroendocrine Cells. *Molecular Endocrinology* 29, 1658–1671. doi: 10.1210/me.2015-1106.

Engevik, A. C., Coutts, A. W., Kaji, I., Rodriguez, P., Ongaratto, F., Saqui-Salces, M., et al. (2020). Editing Myosin VB Gene to Create Porcine Model of Microvillus Inclusion Disease, With Microvillus-Lined Inclusions and Alterations in Sodium Transporters. *Gastroenterology* 158, 2236-2249.e9. doi: 10.1053/j.gastro.2020.02.034.

Estaki, M., DeCoffe, D., and Gibson, D. L. (2014). Interplay between intestinal alkaline phosphatase, diet, gut microbes and immunity. *World Journal of Gastroenterology* 20, 15650–15656. doi: 10.3748/wjg.v20.i42.15650.

F

Ferrandis Vila, M., Trudeau, M. P., Hung, Y.-T., Zeng, Z., Urriola, P. E., Shurson, G. C., et al. (2018). Dietary fiber sources and non-starch polysaccharide-degrading enzymes modify mucin expression and the immune profile of the swine ileum. *PLoS ONE* 13, e0207196. doi: 10.1371/journal.pone.0207196.

Flier, L. G. van der, Haegebarth, A., Stange, D. E., Wetering, M. van de, and Clevers, H. (2009). OLFM4 Is a Robust Marker for Stem Cells in Human Intestine and Marks a Subset of Colorectal Cancer Cells. *Gastroenterology* 137, 15–17. doi: 10.1053/j.gastro.2009.05.035.

Foey, A., Habil, N., Strachan, A., and Beal, J. (2022). Lacticaseibacillus casei Strain Shirota Modulates Macrophage-Intestinal Epithelial Cell Co-Culture Barrier Integrity, Bacterial Sensing and Inflammatory Cytokines. *Microorganisms* 10, 2087. doi: 10.3390/microorganisms10102087.

Frantz, A. L., Rogier, E. W., Weber, C. R., Shen, L., Cohen, D. A., Fenton, L. A., et al. (2012). Targeted deletion of MyD88 in intestinal epithelial cells results in compromised antibacterial immunity associated with downregulation of polymeric immunoglobulin receptor, mucin-2, and antibacterial peptides. *Mucosal Immunology* 5, 501–512. doi: 10.1038/mi.2012.23.

Freire, R., Ingano, L., Serena, G., Cetinbas, M., Anselmo, A., Sapone, A., et al. (2019). Human gut derived-organoids provide model to study gluten response and effects of microbiota-derived molecules in celiac disease. *Sci Rep* 9, 7029. doi: 10.1038/s41598-019-43426-w.

Frese, S. A., Parker, K., Calvert, C. C., and Mills, D. A. (2015). Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning. *Microbiome* 3, 28. doi: 10.1186/s40168-015-0091-8.

Fusunyan, R. D., Quinn, J. J., Ohno, Y., MacDermott, R. P., and Sanderson, I. R. (1998). Butyrate Enhances Interleukin (IL)-8 Secretion by Intestinal Epithelial Cells in Response to IL-1β and Lipopolysaccharide. *Pediatr Res* 43, 84–90. doi: 10.1203/00006450-199801000-00013.

G

Gaisawat, M. B., Lopez-Escalera, S., MacPherson, C. W., Iskandar, M. M., Tompkins, T. A., and Kubow, S. (2022). Probiotics Exhibit Strain-Specific Protective Effects in T84 Cells Challenged With Clostridioides difficile-Infected Fecal Water. *Frontiers in Microbiology* 12. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.698638 [Accessed March 2, 2023].

Gajda, A. M., and Storch, J. (2015). Enterocyte Fatty Acid Binding Proteins (FABPs): Different Functions of Liver- and Intestinal- FABPs in the Intestine. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 93, 9–16. doi: 10.1016/j.plefa.2014.10.001.

Gallo, R. L., and Hooper, L. V. (2012). Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol* 12, 503–516. doi: 10.1038/nri3228.

Gao, X., Nowak-Imialek, M., Chen, X., Chen, D., Herrmann, D., Ruan, D., et al. (2019). Establishment of porcine and human expanded potential stem cells. *Nat Cell Biol* 21, 687–699. doi: 10.1038/s41556-019-0333-2.

García, G. R., Payros, D., Pinton, P., Dogi, C. A., Laffitte, J., Neves, M., et al. (2018). Intestinal toxicity of deoxynivalenol is limited by Lactobacillus rhamnosus RC007 in pig jejunum explants. *Arch Toxicol* 92, 983–993. doi: 10.1007/s00204-017-2083-x.

Garcia, M. A., Nelson, W. J., and Chavez, N. (2018). Cell–Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10, a029181. doi: 10.1101/cshperspect.a029181.

Gaudier, E., Jarry, A., Blottière, H. M., de Coppet, P., Buisine, M. P., Aubert, J. P., et al. (2004). Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 287, G1168–G1174. doi: 10.1152/ajpgi.00219.2004.

Gautier, T., Fahet, N., Tamanai-Shacoori, Z., Oliviero, N., Blot, M., Sauvager, A., et al. (2022). Roseburia intestinalis Modulates PYY Expression in a New a Multicellular Model including Enteroendocrine Cells. *Microorganisms* 10, 2263. doi: 10.3390/microorganisms10112263.

Gehart, H., and Clevers, H. (2019). Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16, 19–34. doi: 10.1038/s41575-018-0081-y.

Ghareeb, K., Awad, W. A., Böhm, J., and Zebeli, Q. (2015). Impacts of the feed contaminant deoxynivalenol on the intestine of monogastric animals: poultry and swine. *Journal of Applied Toxicology* 35, 327–337. doi: 10.1002/jat.3083.

Ghiselli, F., Rossi, B., Piva, A., and Grilli, E. (2021). Assessing Intestinal Health. In Vitro and Ex vivo Gut Barrier Models of Farm Animals: Benefits and Limitations. *Frontiers in Veterinary Science* 8. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2021.723387 [Accessed February 18, 2023].

Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., et al. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and

Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14, 491–502. doi: 10.1038/nrgastro.2017.75.

Gibson, G. R., and Roberfroid, M. B. (1995). Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition* 125, 1401–1412. doi: 10.1093/jn/125.6.1401.

Gonzalez, L. M., Williamson, I., Piedrahita, J. A., Blikslager, A. T., and Magness, S. T. (2013). Cell Lineage Identification and Stem Cell Culture in a Porcine Model for the Study of Intestinal Epithelial Regeneration. *PLOS ONE* 8, e66465. doi: 10.1371/journal.pone.0066465.

Goossens, J., Pasmans, F., Verbrugghe, E., Vandenbroucke, V., De Baere, S., Meyer, E., et al. (2012). Porcine intestinal epithelial barrier disruption by the Fusariummycotoxins deoxynivalenol and T-2 toxin promotes transepithelial passage of doxycycline and paromomycin. *BMC Vet Res* 8, 245. doi: 10.1186/1746-6148-8-245.

Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Fleury, M. A., Van de Wiele, T., Forano, E., and Blanquet-Diot, S. (2017). Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health. *Trends in Microbiology* 25, 851–873. doi: 10.1016/j.tim.2017.05.004.

Gribble, F. M., and Reimann, F. (2016). Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 78, 277–299. doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105439.

Grondin, J. A., Kwon, Y. H., Far, P. M., Haq, S., and Khan, W. I. (2020). Mucins in Intestinal Mucosal Defense and Inflammation: Learning From Clinical and Experimental Studies. *Frontiers in Immunology* 11. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.02054 [Accessed March 20, 2023].

Groschwitz, K. R., and Hogan, S. P. (2009). Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 124, 3–20. doi: 10.1016/j.jaci.2009.05.038.

Grouls, M., Janssen, A. W. F., Duivenvoorde, L. P. M., Hooiveld, G. J. E. J., Bouwmeester, H., and van der Zande, M. (2022). Differential gene expression in iPSC-derived human intestinal epithelial cell layers following exposure to two concentrations of butyrate, propionate and acetate. *Sci Rep* 12, 13988. doi: 10.1038/s41598-022-17296-8.

Guilloteau, P., Martin, L., Eeckhaut, V., Ducatelle, R., Zabielski, R., and Immerseel, F. V. (2010). From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutrition Research Reviews* 23, 366–384. doi: 10.1017/S0954422410000247.

H

Habil, N., Abate, W., Beal, J., and Foey, A. d. (2014). Heat-killed probiotic bacteria differentially regulate colonic epithelial cell production of human β-defensin-2: dependence on inflammatory cytokines. *Beneficial Microbes* 5, 483–495. doi: 10.3920/BM2013.0061.

Hampson, D. J., and Kidder, D. E. (1986). Influence of creep feeding and weaning on brush border enzyme activities in the piglet small intestine. *Research in Veterinary Science* 40, 24–31. doi: 10.1016/S0034-5288(18)30481-8.

Han, X., Mslati, M. A., Davies, E., Chen, Y., Allaire, J. M., and Vallance, B. A. (2021). Creating a More Perfect Union: Modeling Intestinal Bacteria-Epithelial Interactions Using Organoids. *Cellular*

and Molecular Gastroenterology and Hepatology 12, 769–782. doi: 10.1016/j.jcmgh.2021.04.010.

Hanyu, H., Yokoi, Y., Nakamura, K., Ayabe, T., Tanaka, K., Uno, K., et al. (2020). Mycotoxin Deoxynivalenol Has Different Impacts on Intestinal Barrier and Stem Cells by Its Route of Exposure. *Toxins* 12, 610. doi: 10.3390/toxins12100610.

Hashiguchi, M., Kashiwakura, Y., Kanno, Y., Kojima, H., and Kobata, T. (2018). Tumor necrosis factor superfamily member (TNFSF) 13 (APRIL) and TNFSF13B (BAFF) downregulate homeostatic immunoglobulin production in the intestines. *Cellular Immunology* 323, 41–48. doi: 10.1016/j.cellimm.2017.10.009.

Hazime, H., Ducasa, G., Fernandez, I., Brito, N., Santander, A., Pignac-Kobinger, J., et al. (2022). EPITHELIAL DUOX2 ACTIVATION INCREASES GUT PERMEABILITY AND BACTERIAL TRANSLOCATION THAT IS RESCUED WITH BUTYRATE SUPPLEMENTATION. *Gastroenterology* 162, S49. doi: 10.1053/j.gastro.2021.12.102.

He, P., and Yun, C. C. (2010). Mechanisms of the Regulation of the Intestinal Na+/H+Exchanger NHE3. *J Biomed Biotechnol* 2010, 238080. doi: 10.1155/2010/238080.

Helander, H. F., and Fändriks, L. (2014). Surface area of the digestive tract – revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 49, 681–689. doi: 10.3109/00365521.2014.898326.

Hellman, S. (2021). Generation of equine enteroids and enteroid-derived 2D monolayers that are responsive to microbial mimics. *Veterinary Research* 52, 108. doi: 10.1186/s13567-021-00976-0.

Heo, I., Dutta, D., Schaefer, D. A., Iakobachvili, N., Artegiani, B., Sachs, N., et al. (2018). Modelling Cryptosporidium infection in human small intestinal and lung organoids. *Nat Microbiol* 3, 814–823. doi: 10.1038/s41564-018-0177-8.

Heo, J. M., Opapeju, F. O., Pluske, J. R., Kim, J. C., Hampson, D. J., and Nyachoti, C. M. (2013). Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds: Feeding strategies without using in-feed antibiotics. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97, 207–237. doi: 10.1111/j.1439-0396.2012.01284.x.

Heppert, J. K., Davison, J. M., Kelly, C., Mercado, G. P., Lickwar, C. R., and Rawls, J. F. (2021). Transcriptional programmes underlying cellular identity and microbial responsiveness in the intestinal epithelium. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18, 7–23. doi: 10.1038/s41575-020-00357-6.

Herath, M., Hosie, S., Bornstein, J. C., Franks, A. E., and Hill-Yardin, E. L. (2020). The Role of the Gastrointestinal Mucus System in Intestinal Homeostasis: Implications for Neurological Disorders. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00248 [Accessed March 20, 2023].

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., et al. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11, 506–514. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66.

Hoffmann, P., Schnepel, N., Langeheine, M., Künnemann, K., Grassl, G. A., Brehm, R., et al. (2021). Intestinal organoid-based 2D monolayers mimic physiological and pathophysiological properties of the pig intestine. *PLOS ONE* 16, e0256143. doi: 10.1371/journal.pone.0256143.

Hofmann, C., Obermeier, F., Artinger, M., Hausmann, M., Falk, W., Schoelmerich, J., et al. (2007). Cell-Cell Contacts Prevent Anoikis in Primary Human Colonic Epithelial Cells. *Gastroenterology* 132, 587–600. doi: 10.1053/j.gastro.2006.11.017.

Holman, D. B., Brunelle, B. W., Trachsel, J., and Allen, H. K. (2017). Meta-analysis To Define a Core Microbiota in the Swine Gut. *mSystems*. doi: 10.1128/mSystems.00004-17.

Holmberg, F. E., Seidelin, J. B., Yin, X., Mead, B. E., Tong, Z., Li, Y., et al. (2017). Culturing human intestinal stem cells for regenerative applications in the treatment of inflammatory bowel disease. *EMBO Molecular Medicine* 9, 558–570. doi: 10.15252/emmm.201607260.

Holmes, A. H., Moore, L. S. P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., et al. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet* 387, 176–187. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00473-0.

Holthaus, D., Delgado-Betancourt, E., Aebischer, T., Seeber, F., and Klotz, C. (2021). Harmonization of Protocols for Multi-Species Organoid Platforms to Study the Intestinal Biology of Toxoplasma gondii and Other Protozoan Infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10, 935. doi: 10.3389/fcimb.2020.610368.

Howell, K. J., Kraiczy, J., Nayak, K. M., Gasparetto, M., Ross, A., Lee, C., et al. (2018). DNA Methylation and Transcription Patterns in Intestinal Epithelial Cells From Pediatric Patients With Inflammatory Bowel Diseases Differentiate Disease Subtypes and Associate With Outcome. *Gastroenterology* 154, 585–598. doi: 10.1053/j.gastro.2017.10.007.

Hu, C. H., Xiao, K., Luan, Z. S., and Song, J. (2013). Early weaning increases intestinal permeability, alters expression of cytokine and tight junction proteins, and activates mitogen-activated protein kinases in pigs1. *Journal of Animal Science* 91, 1094–1101. doi: 10.2527/jas.2012-5796.

I - J

In, J. G., Foulke-Abel, J., Estes, M. K., Zachos, N. C., Kovbasnjuk, O., and Donowitz, M. (2016). Human mini-guts: new insights into intestinal physiology and host–pathogen interactions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13, 633–642. doi: 10.1038/nrgastro.2016.142.

Iribarren, C., Nordlander, S., Sundin, J., Isaksson, S., Savolainen, O., Törnblom, H., et al. (2022). Fecal luminal factors from patients with irritable bowel syndrome induce distinct gene expression of colonoids. *Neurogastroenterology & Motility* 34, e14390. doi: 10.1111/nmo.14390.

Jelinsky, S. A., Derksen, M., Bauman, E., Verissimo, C. S., van Dooremalen, W. T. M., Roos, J. L., et al. (2023). Molecular and Functional Characterization of Human Intestinal Organoids and Monolayers for Modeling Epithelial Barrier. *Inflammatory Bowel Diseases* 29, 195–206. doi: 10.1093/ibd/izac212.

Johansson, M. E. V., Ambort, D., Pelaseyed, T., Schütte, A., Gustafsson, J. K., Ermund, A., et al. (2011). Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 3635–3641. doi: 10.1007/s00018-011-0822-3.

Johansson, M. E. V., and Hansson, G. C. (2016). Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nature Reviews Immunology* 16, 639–649. doi: 10.1038/nri.2016.88.

Johnson-Henry, K. C., Hagen, K. E., Gordonpour, M., Tompkins, T. A., and Sherman, P. M. (2007). Surface-layer protein extracts from Lactobacillus helveticus inhibit enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cellular Microbiology* 9, 356–367. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00791.x.

K

Kaiko, G. E., Ryu, S. H., Koues, O. I., Collins, P. L., Solnica-Krezel, L., Pearce, E. J., et al. (2016). The Colonic Crypt Protects Stem Cells from Microbiota-Derived Metabolites. *Cell* 165, 1708–1720. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.018.

Kar, S. K., Wells, J. M., Ellen, E. D., te Pas, M. F. W., Madsen, O., Groenen, M. A. M., et al. (2021). Organoids: a promising new in vitro platform in livestock and veterinary research. *Veterinary Research* 52, 43. doi: 10.1186/s13567-021-00904-2.

Kasendra, M., Tovaglieri, A., Sontheimer-Phelps, A., Jalili-Firoozinezhad, S., Bein, A., Chalkiadaki, A., et al. (2018). Development of a primary human Small Intestine-on-a-Chip using biopsy-derived organoids. *Sci Rep* 8, 2871. doi: 10.1038/s41598-018-21201-7.

Katz, J. P., Perreault, N., Goldstein, B. G., Lee, C. S., Labosky, P. A., Yang, V. W., et al. (2002). The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development* 129, 2619–2628.

Kayisoglu, Ö., Schlegel, N., and Bartfeld, S. (2021a). Gastrointestinal epithelial innate immunity-regionalization and organoids as new model. *J Mol Med (Berl)* 99, 517–530. doi: 10.1007/s00109-021-02043-9.

Kayisoglu, O., Weiss, F., Niklas, C., Pierotti, I., Pompaiah, M., Wallaschek, N., et al. (2021b). Location-specific cell identity rather than exposure to GI microbiota defines many innate immune signalling cascades in the gut epithelium. *Gut* 70, 687–697. doi: 10.1136/gutjnl-2019-319919.

Kelly, J., Daly, K., Moran, A. W., Ryan, S., Bravo, D., and Shirazi-Beechey, S. P. (2017). Composition and diversity of mucosa-associated microbiota along the entire length of the pig gastrointestinal tract; dietary influences. *Environmental Microbiology* 19, 1425–1438. doi: 10.1111/1462-2920.13619.

Khalil, H. A., Lei, N. Y., Brinkley, G., Scott, A., Wang, J., Kar, U. K., et al. (2016). A novel culture system for adult porcine intestinal crypts. *Cell Tissue Res.* 365, 123–134. doi: 10.1007/s00441-016-2367-0.

Kiela, P. R., and Ghishan, F. K. (2016). Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 30, 145–159. doi: 10.1016/j.bpg.2016.02.007.

Kim, S., Min, S., Choi, Y. S., Jo, S.-H., Jung, J. H., Han, K., et al. (2022). Tissue extracellular matrix hydrogels as alternatives to Matrigel for culturing gastrointestinal organoids. *Nat Commun* 13, 1692. doi: 10.1038/s41467-022-29279-4.

Kiros, T. G., Luise, D., Derakhshani, H., Petri, R., Trevisi, P., D'Inca, R., et al. (2019). Effect of live yeast Saccharomyces cerevisiae supplementation on the performance and cecum microbial profile of suckling piglets. *PLOS ONE* 14, e0219557. doi: 10.1371/journal.pone.0219557.

Kivelä, A. J., Kivelä, J., Saarnio, J., and Parkkila, S. (2005). Carbonic anhydrases in normal gastrointestinal tract and gastrointestinal tumours. *World J Gastroenterol* 11, 155–163. doi: 10.3748/wjg.v11.i2.155.

Klobasa, F., Werhahn, E., and Butler, J. E. (1987). Composition of Sow Milk During Lactation. *Journal of Animal Science* 64, 1458–1466. doi: 10.2527/jas1987.6451458x.

Knoop, K. A., and Newberry, R. D. (2018). Goblet cells: multifaceted players in immunity at mucosal surfaces. *Mucosal Immunology* 11, 1551–1557. doi: 10.1038/s41385-018-0039-y.

Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., and Bäckhed, F. (2016). From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell* 165, 1332–1345. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.041.

Koltes, D. A., and Gabler, N. K. (2016). Characterization of porcine intestinal enteroid cultures under a lipopolysaccharide challenge1. *Journal of Animal Science* 94, 335–339. doi: 10.2527/jas.2015-9793.

Kozuka, K., He, Y., Koo-McCoy, S., Kumaraswamy, P., Nie, B., Shaw, K., et al. (2017). Development and Characterization of a Human and Mouse Intestinal Epithelial Cell Monolayer Platform. *Stem Cell Reports* 9, 1976–1990. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.10.013.

Kraiczy, J., Nayak, K. M., Howell, K. J., Ross, A., Forbester, J., Salvestrini, C., et al. (2019). DNA methylation defines regional identity of human intestinal epithelial organoids and undergoes dynamic changes during development. *Gut* 68, 49–61. doi: 10.1136/gutjnl-2017-314817.

Kvale, D., and Brandtzaeg, P. (1995). Constitutive and cytokine induced expression of HLA molecules, secretory component, and intercellular adhesion molecule-1 is modulated by butyrate in the colonic epithelial cell line HT-29. *Gut* 36, 737–742. doi: 10.1136/gut.36.5.737.

L

La Rosa, S. L., Leth, M. L., Michalak, L., Hansen, M. E., Pudlo, N. A., Glowacki, R., et al. (2019). The human gut Firmicute Roseburia intestinalis is a primary degrader of dietary β-mannans. *Nat Commun* 10, 905. doi: 10.1038/s41467-019-08812-y.

Lallès, J.-P. (2010). Phosphatase alcaline intestinale : une veille enzyme avec de nouvelles fonctions dans l'homéostasie intestinale et l'absorption des lipides. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 45, 293–300. doi: 10.1016/j.cnd.2010.05.001.

Lallès, J.-P., Bosi, P., Smidt, H., and Stokes, C. R. (2007a). Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proceedings of the Nutrition Society* 66, 260–268. doi: 10.1017/S0029665107005484.

Lallès, J.-P., Bosi, P., Smidt, H., and Stokes, C. R. (2007b). Weaning — A challenge to gut physiologists. *Livestock Science* 108, 82–93. doi: 10.1016/j.livsci.2007.01.091.

Lallès, J.-P., Boudry, G., Favier, C., Floc'h, N. L., Luron, I., Montagne, L., et al. (2004). Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Anim. Res.* 53, 301–316. doi: 10.1051/animres:2004018.

Larraufie, P., Martin-Gallausiaux, C., Lapaque, N., Dore, J., Gribble, F. M., Reimann, F., et al. (2018). SCFAs strongly stimulate PYY production in human enteroendocrine cells. *Sci Rep* 8, 74. doi: 10.1038/s41598-017-18259-0.

Larsson, E., Tremaroli, V., Lee, Y. S., Koren, O., Nookaew, I., Fricker, A., et al. (2012). Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88. *Gut* 61, 1124–1131. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301104.

Le Dividich, J., and Sève, B. (2000). Effects of underfeeding during the weaning period on growth, metabolism, and hormonal adjustments in the piglet. *Domestic Animal Endocrinology* 19, 63–74. doi: 10.1016/S0739-7240(00)00067-9.

Le Floc'h, N., Knudsen, C., Gidenne, T., Montagne, L., Merlot, E., and Zemb, O. (2014). Impact of feed restriction on health, digestion and faecal microbiota of growing pigs housed in good or poor hygiene conditions. *Animal* 8, 1632–1642. doi: 10.1017/S1751731114001608.

Lechuga, S., Braga-Neto, M. B., Naydenov, N. G., Rieder, F., and Ivanov, A. I. (2023). Understanding disruption of the gut barrier during inflammation: Should we abandon traditional epithelial cell lines and switch to intestinal organoids? *Frontiers in Immunology* 14. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1108289 [Accessed April 4, 2023].

Lema, I., Araújo, J. R., Rolhion, N., and Demignot, S. (2020). Jejunum: The understudied meeting place of dietary lipids and the microbiota. *Biochimie* 178, 124–136. doi: 10.1016/j.biochi.2020.09.007.

Lesuffleur, T., Barbat, A., Dussaulx, E., and Zweibaum, A. (1990). Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res* 50, 6334–6343.

Li, L., Fu, F., Guo, S., Wang, H., He, X., Xue, M., et al. (2019a). Porcine Intestinal Enteroids: a New Model for Studying Enteric Coronavirus Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infection and the Host Innate Response. *J. Virol.* 93. doi: 10.1128/JVI.01682-18.

Li, L., Xue, M., Fu, F., Yin, L., Feng, L., and Liu, P. (2019b). IFN-Lambda 3 Mediates Antiviral Protection Against Porcine Epidemic Diarrhea Virus by Inducing a Distinct Antiviral Transcript Profile in Porcine Intestinal Epithelia. *Front Immunol* 10, 2394. doi: 10.3389/fimmu.2019.02394.

Li, X.-G., Zhu, M., Chen, M.-X., Fan, H.-B., Fu, H.-L., Zhou, J.-Y., et al. (2019c). Acute exposure to deoxynivalenol inhibits porcine enteroid activity via suppression of the Wnt/β-catenin pathway. *Toxicol Lett* 305, 19–31. doi: 10.1016/j.toxlet.2019.01.008.

Li, Y., Yang, N., Chen, J., Huang, X., Zhang, N., Yang, S., et al. (2020). Next-Generation Porcine Intestinal Organoids: an Apical-Out Organoid Model for Swine Enteric Virus Infection and Immune Response Investigations. *Journal of Virology* 94, e01006-20. doi: 10.1128/JVI.01006-20.

Lin, C.-H., Lin, P.-P., Lin, C.-Y., Lin, C.-H., Huang, C.-H., Huang, Y.-J., et al. (2016). Decreased mRNA expression for the two subunits of system xc−, SLC3A2 and SLC7A11, in WBC in patients with schizophrenia: Evidence in support of the hypo-glutamatergic hypothesis of schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research* 72, 58–63. doi: 10.1016/j.jpsychires.2015.10.007.

Lin, R., Sun, Y., Mu, P., Zheng, T., Mu, H., Deng, F., et al. (2020). Lactobacillus rhamnosus GG supplementation modulates the gut microbiota to promote butyrate production, protecting against deoxynivalenol exposure in nude mice. *Biochemical Pharmacology* 175, 113868. doi: 10.1016/j.bcp.2020.113868.

Liu, J., Walker, N. M., Cook, M. T., Ootani, A., and Clarke, L. L. (2012). Functional Cftr in crypt epithelium of organotypic enteroid cultures from murine small intestine. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 302, C1492–C1503. doi: 10.1152/ajpcell.00392.2011.

Liu, Y., Chang, J., Wang, P., Yin, Q., Huang, W., Liu, C., et al. (2019). Effects of Saccharomyces cerevisiae on alleviating cytotoxicity of porcine jejunal epithelia cells induced by deoxynivalenol. *AMB Express* 9, 137. doi: 10.1186/s13568-019-0863-9.

Looft, T., Johnson, T. A., Allen, H. K., Bayles, D. O., Alt, D. P., Stedtfeld, R. D., et al. (2012). In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 1691–1696. doi: 10.1073/pnas.1120238109.

Lopetuso, L., Graziani, C., Guarino, A., Lamborghini, A., Masi, S., and Stanghellini, V. (2017). Gelatin tannate and tyndallized probiotics: a novel approach for treatment of diarrhea. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 21, 873–883.

Lopez-Garcia, C., Klein, A. M., Simons, B. D., and Winton, D. J. (2010). Intestinal Stem Cell Replacement Follows a Pattern of Neutral Drift. *Science* 330, 822–825. doi: 10.1126/science.1196236.

Luo, H., Zheng, J., Chen, Y., Wang, T., Zhang, Z., Shan, Y., et al. (2020). Utility Evaluation of Porcine Enteroids as PDCoV Infection Model in vitro. *Front Microbiol* 11, 821. doi: 10.3389/fmicb.2020.00821.

Luo, S., Terciolo, C., Neves, M., Puel, S., Naylies, C., Lippi, Y., et al. (2021). Comparative sensitivity of proliferative and differentiated intestinal epithelial cells to the food contaminant, deoxynivalenol. *Environ Pollut* 277, 116818. doi: 10.1016/j.envpol.2021.116818.

M

Ma, P., Fang, P., Ren, T., Fang, L., and Xiao, S. (2022). Porcine Intestinal Organoids: Overview of the State of the Art. *Viruses* 14, 1110. doi: 10.3390/v14051110.

Mabbott, N. A., Donaldson, D. S., Ohno, H., Williams, I. R., and Mahajan, A. (2013). Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunology* 6, 666–677. doi: 10.1038/mi.2013.30.

Mach, N., Berri, M., Estellé, J., Levenez, F., Lemonnier, G., Denis, C., et al. (2015). Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. *Environmental Microbiology Reports* 7, 554–569. doi: 10.1111/1758-2229.12285.

MacPherson, C., Audy, J., Mathieu, O., and Tompkins, T. A. (2014). Multistrain Probiotic Modulation of Intestinal Epithelial Cells' Immune Response to a Double-Stranded RNA Ligand, Poly(I·C). *Applied and Environmental Microbiology* 80, 1692–1700. doi: 10.1128/AEM.03411-13.

Madec, F., Bridoux, N., Bounaix, S., and Jestin, A. (1998). Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors. *Preventive Veterinary Medicine* 35, 53–72. doi: 10.1016/S0167-5877(97)00057-3.

Mahe, M. M., Sundaram, N., Watson, C. L., Shroyer, N. F., and Helmrath, M. A. (2015). Establishment of human epithelial enteroids and colonoids from whole tissue and biopsy. *J Vis Exp*, 52483. doi: 10.3791/52483.

Mahler, G. J., Shuler, M. L., and Glahn, R. P. (2009). Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an in vitro digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 20, 494–502. doi: 10.1016/j.jnutbio.2008.05.006.

Maidana, L. G., Gerez, J., Hohmann, M. N. S., Verri, W. A., and Bracarense, A. P. F. L. (2021). Lactobacillus plantarum metabolites reduce deoxynivalenol toxicity on jejunal explants of piglets. *Toxicon* 203, 12–21. doi: 10.1016/j.toxicon.2021.09.023.

Marcobal, A., and Sonnenburg, J. L. (2012). Human milk oligosaccharide consumption by intestinal microbiota. *Clinical Microbiology and Infection* 18, 12–15. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03863.x.

Marion, J., Petersen, Y. M., Romé, V., Thomas, F., Sangild, P. T., Dividich, J. L., et al. (2005). Early Weaning Stimulates Intestinal Brush Border Enzyme Activities in Piglets, Mainly at the Posttranscriptional Level. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 41, 401. doi: 10.1097/01.mpg.0000177704.99786.07.

Marks, H., Grześkowiak, Ł., Martinez-Vallespin, B., Dietz, H., and Zentek, J. (2022). Porcine and Chicken Intestinal Epithelial Cell Models for Screening Phytogenic Feed Additives—Chances and Limitations in Use as Alternatives to Feeding Trials. *Microorganisms* 10, 629. doi: 10.3390/microorganisms10030629.

Maron, D. F., Smith, T. J., and Nachman, K. E. (2013). Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Globalization and Health* 9, 48. doi: 10.1186/1744-8603-9-48.

Massacci, F. R., Berri, M., Lemonnier, G., Guettier, E., Blanc, F., Jardet, D., et al. (2020). Late weaning is associated with increased microbial diversity and Faecalibacterium prausnitzii abundance in the fecal microbiota of piglets. *Animal Microbiome* 2, 2. doi: 10.1186/s42523-020-0020-4.

Matano, M., Date, S., Shimokawa, M., Takano, A., Fujii, M., Ohta, Y., et al. (2015). Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9–mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat Med* 21, 256–262. doi: 10.1038/nm.3802.

McCracken, B. A., Spurlock, M. E., Roos, M. A., Zuckermann, F. A., and Gaskins, H. R. (1999). Weaning Anorexia May Contribute to Local Inflammation in the Piglet Small Intestine. *The Journal of Nutrition* 129, 613–619. doi: 10.1093/jn/129.3.613.

Meran, L., Baulies, A., and Li, V. S. W. (2017). Intestinal Stem Cell Niche: The Extracellular Matrix and Cellular Components. *Stem Cells International* 2017, e7970385. doi: 10.1155/2017/7970385.

Merker, S. R., Weitz, J., and Stange, D. E. (2016). Gastrointestinal organoids: How they gut it out. *Developmental Biology* 420, 239–250. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.08.010.

Messaoudi, M., Lalonde, R., Violle, N., Javelot, H., Desor, D., Nejdi, A., et al. (2011). Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175) in rats and human subjects. *British Journal of Nutrition* 105, 755–764. doi: 10.1017/S0007114510004319.

Middelkoop, A., Costermans, N., Kemp, B., and Bolhuis, J. E. (2019). Feed intake of the sow and playful creep feeding of piglets influence piglet behaviour and performance before and after weaning. *Sci Rep* 9, 16140. doi: 10.1038/s41598-019-52530-w.

Middendorp, S., Schneeberger, K., Wiegerinck, C. L., Mokry, M., Akkerman, R. D. L., Wijngaarden, S., et al. (2014). Adult Stem Cells in the Small Intestine Are Intrinsically Programmed with Their Location-Specific Function. *Stem Cells* 32, 1083–1091. doi: 10.1002/stem.1655.

Moeser, A. J., and Blikslager, A. T. (2007). Mechanisms of porcine diarrheal disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 231, 56–67. doi: 10.2460/javma.231.1.56.

Moeser, A. J., Klok, C. V., Ryan, K. A., Wooten, J. G., Little, D., Cook, V. L., et al. (2007a). Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 292, G173–G181. doi: 10.1152/ajpgi.00197.2006.

Moeser, A. J., Pohl, C. S., and Rajput, M. (2017). Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. *Animal Nutrition* 3, 313–321. doi: 10.1016/j.aninu.2017.06.003.

Moeser, A. J., Ryan, K. A., Nighot, P. K., and Blikslager, A. T. (2007b). Gastrointestinal dysfunction induced by early weaning is attenuated by delayed weaning and mast cell blockade in pigs. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 293, G413–G421. doi: 10.1152/ajpgi.00304.2006.

Mohammad, M. A., Didelija, I. C., Stoll, B., Burrin, D. G., and Marini, J. C. (2020). Modeling age-dependent developmental changes in the expression of genes involved in citrulline synthesis using pig enteroids. *Physiol Rep* 8, e14565. doi: 10.14814/phy2.14565.

Mohammadi, S., Morell-Perez, C., Wright, C. W., Wyche, T. P., White, C. H., Sana, T. R., et al. (2021). Assessing donor-to-donor variability in human intestinal organoid cultures. *Stem Cell Reports* 16, 2364–2378. doi: 10.1016/j.stemcr.2021.07.016.

Montagne, L., Boudry, G., Favier, C., Huërou-Luron, I. L., Lallès, J.-P., and Sève, B. (2007). Main intestinal markers associated with the changes in gut architecture and function in piglets after weaning. *British Journal of Nutrition* 97, 45–57. doi: 10.1017/S000711450720580X.

Moon, C., VanDussen, K. L., Miyoshi, H., and Stappenbeck, T. S. (2014). Development of a primary mouse intestinal epithelial cell monolayer culture system to evaluate factors that modulate IgA transcytosis. *Mucosal Immunology* 7, 818–828. doi: 10.1038/mi.2013.98.

Motta, J.-P., Denadai-Souza, A., Sagnat, D., Guiraud, L., Edir, A., Bonnart, C., et al. (2019). Active thrombin produced by the intestinal epithelium controls mucosal biofilms. *Nat Commun* 10, 3224. doi: 10.1038/s41467-019-11140-w.

Mowat, A. M., and Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol* 14, 667–685. doi: 10.1038/nri3738.

Muñoz, J., Stange, D. E., Schepers, A. G., van de Wetering, M., Koo, B.-K., Itzkovitz, S., et al. (2012). The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent '+4' cell markers. *The EMBO Journal* 31, 3079–3091. doi: 10.1038/emboj.2012.166.

Mussard, E., Lencina, C., Boudry, G., Achard, C. S., Klotz, C., Combes, S., et al. (2023). Culture of Piglet Intestinal 3D Organoids from Cryopreserved Epithelial Crypts and Establishment of Cell Monolayers. *J Vis Exp*. doi: 10.3791/64917.

Mussard, E., Lencina, C., Gallo, L., Barilly, C., Poli, M., Feve, K., 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. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.983031 [Accessed September 16, 2022].

Mussard, E., Pouzet, C., Helies, V., Pascal, G., Fourre, S., Cherbuy, C., 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. doi: 10.1016/j.scr.2020.101980.

N

Nagy, B., and Fekete, P. Zs. (2005). Enterotoxigenic Escherichia coli in veterinary medicine. *International Journal of Medical Microbiology* 295, 443–454. doi: 10.1016/j.ijmm.2005.07.003.

Navis, M., Martins Garcia, T., Renes, I. B., Vermeulen, J. L., Meisner, S., Wildenberg, M. E., et al. (2019). Mouse fetal intestinal organoids: new model to study epithelial maturation from suckling to weaning. *EMBO Rep* 20. doi: 10.15252/embr.201846221.

Neutra, M. R., Mantis, N. J., and Kraehenbuhl, J.-P. (2001). Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol* 2, 1004–1009. doi: 10.1038/ni1101-1004.

Nie, K., Ma, K., Luo, W., Shen, Z., Yang, Z., Xiao, M., et al. (2021). Roseburia intestinalis: A Beneficial Gut Organism From the Discoveries in Genus and Species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.757718 [Accessed April 3, 2023].

Nielsen, D. S. G., Jensen, B. B., Theil, P. K., Nielsen, T. S., Knudsen, K. E. B., and Purup, S. (2018). Effect of butyrate and fermentation products on epithelial integrity in a mucus-secreting human colon cell line. *Journal of Functional Foods* 40, 9–17. doi: 10.1016/j.jff.2017.10.023.

Nikolaev, M., Mitrofanova, O., Broguiere, N., Geraldo, S., Dutta, D., Tabata, Y., et al. (2020). Homeostatic mini-intestines through scaffold-guided organoid morphogenesis. *Nature* 585, 574–578. doi: 10.1038/s41586-020-2724-8.

Noel, G., Baetz, N. W., Staab, J. F., Donowitz, M., Kovbasnjuk, O., Pasetti, M. F., et al. (2017). A primary human macrophage-enteroid co-culture model to investigate mucosal gut physiology and host-pathogen interactions. *Sci Rep* 7, 45270. doi: 10.1038/srep45270.

Noel, G., In, J. G., Lemme-Dumit, J. M., DeVine, L. R., Cole, R. N., Guerrerio, A. L., et al. (2021). Human Breast Milk Enhances Intestinal Mucosal Barrier Function and Innate Immunity in a Healthy Pediatric Human Enteroid Model. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.685171 [Accessed March 22, 2023].

Nossol, C., Barta-Böszörményi, A., Kahlert, S., Zuschratter, W., Faber-Zuschratter, H., Reinhardt, N., et al. (2015). Comparing Two Intestinal Porcine Epithelial Cell Lines (IPECs): Morphological Differentiation, Function and Metabolism. *PLOS ONE* 10, e0132323. doi: 10.1371/journal.pone.0132323.

Nossol, C., Diesing, A.-K., Walk, N., Faber-Zuschratter, H., Hartig, R., Post, A., et al. (2011). Air–liquid interface cultures enhance the oxygen supply and trigger the structural and functional

differentiation of intestinal porcine epithelial cells (IPEC). *Histochem Cell Biol* 136, 103–115. doi: 10.1007/s00418-011-0826-y.

Nozaki, K., Mochizuki, W., Matsumoto, Y., Matsumoto, T., Fukuda, M., Mizutani, T., et al. (2016). Co-culture with intestinal epithelial organoids allows efficient expansion and motility analysis of intraepithelial lymphocytes. *J Gastroenterol* 51, 206–213. doi: 10.1007/s00535-016-1170-8.

Nugteren, S., and Samsom, J. N. (2021). Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) in mucosal tissues: Protects against inflammation, but promotes cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 59, 22–35. doi: 10.1016/j.cytogfr.2021.01.005.

Nusse, R., and Clevers, H. (2017). Wnt/β-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 169, 985–999. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.016.

O

Olivares, M., Schüppel, V., Hassan, A. M., Beaumont, M., Neyrinck, A. M., Bindels, L. B., et al. (2018). The Potential Role of the Dipeptidyl Peptidase-4-Like Activity From the Gut Microbiota on the Host Health. *Frontiers in Microbiology* 9. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01900 [Accessed February 4, 2023].

Oshima, T., Sasaki, M., Kataoka, H., Miwa, H., Takeuchi, T., and Joh, T. (2007). Wip1 protects hydrogen peroxide-induced colonic epithelial barrier dysfunction. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 3139–3147. doi: 10.1007/s00018-007-7268-7.

Ozaka, S., Sonoda, A., Ariki, S., Kamiyama, N., Hidano, S., Sachi, N., et al. (2021). Protease inhibitory activity of secretory leukocyte protease inhibitor ameliorates murine experimental colitis by protecting the intestinal epithelial barrier. *Genes to Cells* 26, 807–822. doi: 10.1111/gtc.12888.

P-Q

Palma, M. L., Zamith-Miranda, D., Martins, F. S., Bozza, F. A., Nimrichter, L., Montero-Lomeli, M., et al. (2015). Probiotic Saccharomyces cerevisiae strains as biotherapeutic tools: is there room for improvement? *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 6563–6570. doi: 10.1007/s00253-015-6776-x.

Pan, P., Rodriguez, A., and Parkkila, S. (2007). A systematic quantification of carbonic anhydrase transcripts in the mouse digestive system. *BMC Mol Biol* 8, 22. doi: 10.1186/1471-2199-8-22.

Pang, Y., Zhang, H., Wen, H., Wan, H., Wu, H., Chen, Y., et al. (2022). Yeast Probiotic and Yeast Products in Enhancing Livestock Feeds Utilization and Performance: An Overview. *Journal of Fungi* 8, 1191. doi: 10.3390/jof8111191.

Paul, M., Leblanc-Maridor, M., Rousset, N., Hemonic, A., Marguerie, J., Coz, P. le, et al. (2022). Réduction de l'usage des antibiotiques en filières monogastriques : état d'avancement et perspectives. *INRAE Productions Animales* 35, 293–306. doi: 10.20870/productions-animales.2022.35.4.7322.

Pearce, S. C., Weber, G. J., van Sambeek, D. M., Soares, J. W., Racicot, K., and Breault, D. T. (2020). Intestinal enteroids recapitulate the effects of short-chain fatty acids on the intestinal epithelium. *PLoS One* 15, e0230231. doi: 10.1371/journal.pone.0230231.

Pelaseyed, T., Bergström, J. H., Gustafsson, J. K., Ermund, A., Birchenough, G. M. H., Schütte, A., et al. (2014). The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunological Reviews* 260, 8–20. doi: 10.1111/imr.12182.

Peng, L., He, Z., Chen, W., Holzman, I. R., and Lin, J. (2007). Effects of Butyrate on Intestinal Barrier Function in a Caco-2 Cell Monolayer Model of Intestinal Barrier. *Pediatr Res* 61, 37–41. doi: 10.1203/01.pdr.0000250014.92242.f3.

Peng, L., Li, Z.-R., Green, R. S., Holzman, I. R., and Lin, J. (2009). Butyrate Enhances the Intestinal Barrier by Facilitating Tight Junction Assembly via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Caco-2 Cell Monolayers. *The Journal of Nutrition* 139, 1619–1625. doi: 10.3945/jn.109.104638.

Pereira, C., Costa, J., Sarmento, B., and Araújo, F. (2016). "3.3 - Cell-based in vitro models for intestinal permeability studies," in *Concepts and Models for Drug Permeability Studies*, ed. B. Sarmento (Woodhead Publishing), 57–81. doi: 10.1016/B978-0-08-100094-6.00005-5.

Peterson, L. W., and Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14, 141–153. doi: 10.1038/nri3608.

Pié, S., Lallès, J. P., Blazy, F., Laffitte, J., Sève, B., and Oswald, I. P. (2004). Weaning Is Associated with an Upregulation of Expression of Inflammatory Cytokines in the Intestine of Piglets. *The Journal of Nutrition* 134, 641–647. doi: 10.1093/jn/134.3.641.

Pierron, A., Alassane-Kpembi, I., and Oswald, I. P. (2016). Impact of two mycotoxins deoxynivalenol and fumonisin on pig intestinal health. *Porcine Health Management* 2, 21. doi: 10.1186/s40813-016-0041-2.

Pinton, P., and Oswald, I. P. (2014). Effect of Deoxynivalenol and Other Type B Trichothecenes on the Intestine: A Review. *Toxins* 6, 1615–1643. doi: 10.3390/toxins6051615.

Piqué, N., Berlanga, M., and Miñana-Galbis, D. (2019). Health Benefits of Heat-Killed (Tyndallized) Probiotics: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 2534. doi: 10.3390/ijms20102534.

Pompili, S., Latella, G., Gaudio, E., Sferra, R., and Vetuschi, A. (2021). The Charming World of the Extracellular Matrix: A Dynamic and Protective Network of the Intestinal Wall. *Front Med (Lausanne)* 8, 610189. doi: 10.3389/fmed.2021.610189.

Powell, R. H., and Behnke, M. S. (2017). WRN conditioned media is sufficient for *in vitro* propagation of intestinal organoids from large farm and small companion animals. *Biology Open* 6, 698–705. doi: 10.1242/bio.021717.

Propheter, D. C., Chara, A. L., Harris, T. A., Ruhn, K. A., and Hooper, L. V. (2017). Resistin-like molecule β is a bactericidal protein that promotes spatial segregation of the microbiota and the colonic epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 11027–11033. doi: 10.1073/pnas.1711395114.

Qiu, Y., Yang, J., Wang, L., Yang, X., Gao, K., Zhu, C., et al. (2021). Dietary resveratrol attenuation of intestinal inflammation and oxidative damage is linked to the alteration of gut microbiota and butyrate in piglets challenged with deoxynivalenol. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 12, 71. doi: 10.1186/s40104-021-00596-w.

R

Randall, K. J., Turton, J., and Foster, J. R. (2011). Explant culture of gastrointestinal tissue: a review of methods and applications. *Cell Biol Toxicol* 27, 267–284. doi: 10.1007/s10565-011-9187-5.

Rawling, M. D., Pontefract, N., Rodiles, A., Anagnostara, I., Leclercq, E., Schiavone, M., et al. (2019). The effect of feeding a novel multistrain yeast fraction on European seabass (Dicentrachus labrax) intestinal health and growth performance. *Journal of the World Aquaculture Society* 50, 1108–1122. doi: 10.1111/jwas.12591.

Rawling, M., Leclercq, E., Foey, A., Castex, M., and Merrifield, D. (2021). A novel dietary multi-strain yeast fraction modulates intestinal toll-like-receptor signalling and mucosal responses of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *PLOS ONE* 16, e0245021. doi: 10.1371/journal.pone.0245021.

Resende, T. P., Medida, R. L., Vannucci, F. A., Saqui-Salces, M., and Gebhart, C. (2020). Evaluation of swine enteroids as in vitro models for Lawsonia intracellularis infection1,2. *Journal of Animal Science* 98, skaa011. doi: 10.1093/jas/skaa011.

Richter, J. M., Schanbacher, B. L., Huang, H., Xue, J., Bauer, J. A., and Giannone, P. J. (2012). Lipopolysaccharide Binding Protein Enables Intestinal Epithelial Restitution Despite Lipopolysaccharide Exposure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 54, 639–644. doi: 10.1097/MPG.0b013e31823a895a.

Rojas, R., and Apodaca, G. (2002). Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 944–956. doi: 10.1038/nrm972.

Rowan, J. P., Durrance, K. L., Combs, G. E., and Fisher, L. Z. (1997). The Digestive Tract of the Pig.

S

Saladrigas-García, M., D'Angelo, M., Ko, H. L., Nolis, P., Ramayo-Caldas, Y., Folch, J. M., et al. (2021). Understanding host-microbiota interactions in the commercial piglet around weaning. *Sci Rep* 11, 23488. doi: 10.1038/s41598-021-02754-6.

Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., et al. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18, 649–667. doi: 10.1038/s41575-021-00440-6.

Salvi, P. S., and Cowles, R. A. (2021). Butyrate and the Intestinal Epithelium: Modulation of Proliferation and Inflammation in Homeostasis and Disease. *Cells* 10, 1775. doi: 10.3390/cells10071775.

Sancho, R., Cremona, C. A., and Behrens, A. (2015). Stem cell and progenitor fate in the mammalian intestine: Notch and lateral inhibition in homeostasis and disease. *EMBO reports* 16, 571–581. doi: 10.15252/embr.201540188.

Sato, T., Stange, D. E., Ferrante, M., Vries, R. G. J., van Es, J. H., van den Brink, S., et al. (2011a). Long-term Expansion of Epithelial Organoids From Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett's Epithelium. *Gastroenterology* 141, 1762–1772. doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.050.

Sato, T., van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., van den Born, M., et al. (2011b). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469, 415–418. doi: 10.1038/nature09637.

Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., et al. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262–265. doi: 10.1038/nature07935.

Saxena, K., Blutt, S. E., Ettayebi, K., Zeng, X.-L., Broughman, J. R., Crawford, S. E., et al. (2015). Human Intestinal Enteroids: a New Model To Study Human Rotavirus Infection, Host Restriction, and Pathophysiology. *Journal of Virology* 90, 43–56. doi: 10.1128/JVI.01930-15.

Schierack, P., Nordhoff, M., Pollmann, M., Weyrauch, K. D., Amasheh, S., Lodemann, U., et al. (2006). Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem Cell Biol* 125, 293–305. doi: 10.1007/s00418-005-0067-z.

Sébert, M., Sola-Tapias, N., Mas, E., Barreau, F., and Ferrand, A. (2019). Protease-Activated Receptors in the Intestine: Focus on Inflammation and Cancer. *Frontiers in Endocrinology* 10. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2019.00717 [Accessed March 31, 2023].

Senger, S., Ingano, L., Freire, R., Anselmo, A., Zhu, W., Sadreyev, R., et al. (2018). Human Fetal-Derived Enterospheres Provide Insights on Intestinal Development and a Novel Model to Study Necrotizing Enterocolitis (NEC). *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 5, 549–568. doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.01.014.

Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N. V., Zucca, P., Varoni, E. M., Dini, L., Panzarini, E., et al. (2020). Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in Physiology* 11. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2020.00694 [Accessed March 31, 2023].

Sherman, P. M., Johnson-Henry, K. C., Yeung, H. P., Ngo, P. S. C., Goulet, J., and Tompkins, T. A. (2005). Probiotics Reduce Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7- and Enteropathogenic E. coli O127:H6-Induced Changes in Polarized T84 Epithelial Cell Monolayers by Reducing Bacterial Adhesion and Cytoskeletal Rearrangements. *Infection and Immunity* 73, 5183–5188. doi: 10.1128/IAI.73.8.5183-5188.2005.

Shimizu, M., Shimizu, Y., and Kodama, Y. (1978). Effects of Ambient Temperatures on Induction of Transmissible Gastroenteritis in Feeder Pigs. *Infection and Immunity* 21, 747–752. doi: 10.1128/iai.21.3.747-752.1978.

Sidar, B., Jenkins, B. R., Huang, S., Spence, J. R., Walk, S. T., and Wilking, J. N. (2019). Long-term flow through human intestinal organoids with the gut organoid flow chip (GOFlowChip). *Lab Chip* 19, 3552–3562. doi: 10.1039/C9LC00653B.

Smith, F., Clark, J. E., Overman, B. L., Tozel, C. C., Huang, J. H., Rivier, J. E. F., et al. (2010). Early weaning stress impairs development of mucosal barrier function in the porcine intestine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 298, G352–G363. doi: 10.1152/ajpgi.00081.2009.

Snippert, H. J., van der Flier, L. G., Sato, T., van Es, J. H., van den Born, M., Kroon-Veenboer, C., et al. (2010). Intestinal Crypt Homeostasis Results from Neutral Competition between Symmetrically Dividing Lgr5 Stem Cells. *Cell* 143, 134–144. doi: 10.1016/j.cell.2010.09.016.

Snoeck, V., Huyghebaert, N., Cox, E., Vermeire, A., Saunders, J., Remon, J. P., et al. (2004). Gastrointestinal transit time of nondisintegrating radio-opaque pellets in suckling and recently weaned piglets. *Journal of Controlled Release* 94, 143–153. doi: 10.1016/j.jconrel.2003.09.015.

Spence, J. R., Mayhew, C. N., Rankin, S. A., Kuhar, M. F., Vallance, J. E., Tolle, K., et al. (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* 470, 105–109. doi: 10.1038/nature09691.

Spreeuwenberg, M. A. M., Verdonk, J. M. A. J., Gaskins, H. R., and Verstegen, M. W. A. (2001). Small Intestine Epithelial Barrier Function Is Compromised in Pigs with Low Feed Intake at Weaning. *The Journal of Nutrition* 131, 1520–1527. doi: 10.1093/jn/131.5.1520.

Srinivasan, B., Kolli, A. R., Esch, M. B., Abaci, H. E., Shuler, M. L., and Hickman, J. J. (2015). TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom* 20, 107–126. doi: 10.1177/2211068214561025.

Staab, J. F., Lemme-Dumit, J. M., Latanich, R., Pasetti, M. F., and Zachos, N. C. (2020). Co-Culture System of Human Enteroids/Colonoids with Innate Immune Cells. *Current Protocols in Immunology* 131, e113. doi: 10.1002/cpim.113.

Stelzner, M., Helmrath, M., Dunn, J. C. Y., Henning, S. J., Houchen, C. W., Kuo, C., et al. (2012). A nomenclature for intestinal in vitro cultures. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 302, G1359–G1363. doi: 10.1152/ajpgi.00493.2011.

Strech, D., and Dirnagl, U. (2019). 3Rs missing: animal research without scientific value is unethical. *BMJ Open Sci* 3, bmjos-2018-000048. doi: 10.1136/bmjos-2018-000048.

Strong, T. V., Boehm, K., and Collins, F. S. (1994). Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA in the human gastrointestinal tract by in situ hybridization. *J Clin Invest* 93, 347–354. doi: 10.1172/JCI116966.

Subtil, B., Iyer, K. K., Poel, D., Bakkerus, L., Gorris, M. A. J., Escalona, J. C., et al. (2023). Dendritic cell phenotype and function in a 3D co-culture model of patient-derived metastatic colorectal cancer organoids. *Frontiers in Immunology* 14. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1105244 [Accessed April 17, 2023].

Sutton, K. M., Orr, B., Hope, J., Jensen, S. R., and Vervelde, L. (2022). Establishment of bovine 3D enteroid-derived 2D monolayers. *Vet Res* 53, 15. doi: 10.1186/s13567-022-01033-0.

Swanson, K. S., Gibson, G. R., Hutkins, R., Reimer, R. A., Reid, G., Verbeke, K., et al. (2020). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17, 687–701. doi: 10.1038/s41575-020-0344-2.

T

Takahashi, Y., Inoue, Y., Kuze, K., Sato, S., Shimizu, M., Kiyono, H., et al. (2021). Comparison of gene expression and activation of transcription factors in organoid-derived monolayer intestinal epithelial cells and organoids. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 85, 2137–2144. doi: 10.1093/bbb/zbab136.

Tang, W., Liu, J., Ma, Y., Wei, Y., Liu, J., and Wang, H. (2021). Impairment of Intestinal Barrier Function Induced by Early Weaning via Autophagy and Apoptosis Associated With Gut Microbiome and Metabolites. *Frontiers in Immunology* 12. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.804870 [Accessed January 27, 2023].

Tang, W., Zhong, Y., Wei, Y., Deng, Z., Mao, J., Liu, J., et al. (2022a). Ileum tissue single-cell mRNA sequencing elucidates the cellular architecture of pathophysiological changes associated with weaning in piglets. *BMC Biology* 20, 123. doi: 10.1186/s12915-022-01321-3.

Tang, X., Xiong, K., Fang, R., and Li, M. (2022b). Weaning stress and intestinal health of piglets: A review. *Frontiers in Immunology* 13. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.1042778 [Accessed January 27, 2023].

Tao, X., Xu, Z., and Wan, J. (2015). Intestinal microbiota diversity and expression of pattern recognition receptors in newly weaned piglets. *Anaerobe* 32, 51–56. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.12.005.

Terciolo, C., Dobric, A., Ouaissi, M., Siret, C., Breuzard, G., Silvy, F., et al. (2017). Saccharomyces boulardii CNCM I-745 Restores intestinal Barrier Integrity by Regulation of E-cadherin Recycling. *Journal of Crohn's and Colitis* 11, 999–1010. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjx030.

The Principles of Humane Experimental Technique (1960). *Medical Journal of Australia* 1, 500–500. doi: 10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x.

Thompson, C. A., DeLaForest, A., and Battle, M. A. (2018). Patterning the gastrointestinal epithelium to confer regional-specific functions. *Developmental Biology* 435, 97–108. doi: 10.1016/j.ydbio.2018.01.006.

Tompson, A. C., Manderson, L., and Chandler, C. I. R. (2021). Understanding antibiotic use: practices, structures and networks. *JAC Antimicrob Resist* 3, dlab150. doi: 10.1093/jacamr/dlab150.

Tong, X., Yin, L., and Giardina, C. (2004). Butyrate suppresses Cox-2 activation in colon cancer cells through HDAC inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317, 463–471. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.03.066.

Trevisi, P., Latorre, R., Priori, D., Luise, D., Archetti, I., Mazzoni, M., et al. (2017). Effect of feed supplementation with live yeast on the intestinal transcriptome profile of weaning pigs orally challenged with Escherichia coli F4. *Animal* 11, 33–44. doi: 10.1017/S1751731116001178.

Tsai, Y.-H., Czerwinski, M., Wu, A., Dame, M. K., Attili, D., Hill, E., et al. (2018). A Method for Cryogenic Preservation of Human Biopsy Specimens and Subsequent Organoid Culture. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 6, 218-222.e7. doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.04.008.

U

Ubelmann, F., Chamaillard, M., El-Marjou, F., Simon, A., Netter, J., Vignjevic, D., et al. (2013). Enterocyte loss of polarity and gut wound healing rely upon the F-actin–severing function of villin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, E1380–E1389. doi: 10.1073/pnas.1218446110.

Ueo, T., Imayoshi, I., Kobayashi, T., Ohtsuka, T., Seno, H., Nakase, H., et al. (2012). The role of Hes genes in intestinal development, homeostasis and tumor formation. *Development* 139, 1071–1082. doi: 10.1242/dev.069070.

Upadhaya, S. D., Bravo de Laguna, F., Bertaud, B., and Kim, I.-H. (2019). Multi-strain yeast fraction product supplementation can alleviate weaning stress and improve performance and health of piglets raised under low sanitary conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99, 6076–6083. doi: 10.1002/jsfa.9885.

V

van Beers-Schreurs, H. M. G., Nabuurs, M. J. A., Vellenga, L., Valk, H. J. K. der, Wensing, T., and Breukink, H. J. (1998). Weaning and the Weanling Diet Influence the Villous Height and Crypt Depth in the Small Intestine of Pigs and Alter the Concentrations of Short-Chain Fatty Acids in the Large Intestine and Blood. *The Journal of Nutrition* 128, 947–953. doi: 10.1093/jn/128.6.947.

van der Flier, L. G., and Clevers, H. (2009). Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 241–260. doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163145.

van der Flier, L. G., van Gijn, M. E., Hatzis, P., Kujala, P., Haegebarth, A., Stange, D. E., et al. (2009). Transcription Factor Achaete Scute-Like 2 Controls Intestinal Stem Cell Fate. *Cell* 136, 903–912. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.031.

van der Hee, B., Loonen, L. M. P., Taverne, N., Taverne-Thiele, J. J., Smidt, H., and Wells, J. M. (2018). Optimized procedures for generating an enhanced, near physiological 2D culture system from porcine intestinal organoids. *Stem Cell Research* 28, 165–171. doi: 10.1016/j.scr.2018.02.013.

van der Hee, B., Madsen, O., Vervoort, J., Smidt, H., and Wells, J. M. (2020). Congruence of Transcription Programs in Adult Stem Cell-Derived Jejunum Organoids and Original Tissue During Long-Term Culture. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 375. doi: 10.3389/fcell.2020.00375.

van der Hee, B., and Wells, J. M. (2021). Microbial Regulation of Host Physiology by Short-chain Fatty Acids. *Trends in Microbiology* 29, 700–712. doi: 10.1016/j.tim.2021.02.001.

Vancamelbeke, M., Laeremans, T., Vanhove, W., Arnauts, K., Ramalho, A. S., Farré, R., et al. (2019). Butyrate Does Not Protect Against Inflammation-induced Loss of Epithelial Barrier Function and Cytokine Production in Primary Cell Monolayers From Patients With Ulcerative Colitis. *Journal of Crohn's and Colitis* 13, 1351–1361. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjz064.

VanDussen, K. L., Carulli, A. J., Keeley, T. M., Patel, S. R., Puthoff, B. J., Magness, S. T., et al. (2012). Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development* 139, 488–497. doi: 10.1242/dev.070763.

VanDussen, K. L., Marinshaw, J. M., Shaikh, N., Miyoshi, H., Moon, C., Tarr, P. I., et al. (2015). Development of an enhanced human gastrointestinal epithelial culture system to facilitate patient-based assays. *Gut* 64, 911–920. doi: 10.1136/gutjnl-2013-306651.

Venuprasad, K., and Theiss, A. L. (2021). NLRP6 in host defense and intestinal inflammation. *Cell Rep* 35, 109043. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109043.

Vergauwen, H. (2015). "The IPEC-J2 Cell Line," in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, eds. K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie,

et al. (Cham (CH): Springer). Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500147/ [Accessed March 8, 2023].

Vergauwen, H., Tambuyzer, B., Jennes, K., Degroote, J., Wang, W., Smet, S. D., et al. (2015). Trolox and Ascorbic Acid Reduce Direct and Indirect Oxidative Stress in the IPEC-J2 Cells, an In Vitro Model for the Porcine Gastrointestinal Tract. *PLOS ONE* 10, e0120485. doi: 10.1371/journal.pone.0120485.

Vergnolle, N. (2016). Protease inhibition as new therapeutic strategy for GI diseases. *Gut* 65, 1215–1224. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309147.

Vermeire, B., Gonzalez, L. M., Jansens, R. J. J., Cox, E., and Devriendt, B. (2021). Porcine small intestinal organoids as a model to explore ETEC–host interactions in the gut. *Veterinary Research* 52, 94. doi: 10.1186/s13567-021-00961-7.

Vonk, A. M., van Mourik, P., Ramalho, A. S., Silva, I. A. L., Statia, M., Kruisselbrink, E., et al. (2020). Protocol for Application, Standardization and Validation of the Forskolin-Induced Swelling Assay in Cystic Fibrosis Human Colon Organoids. *STAR Protocols* 1, 100019. doi: 10.1016/j.xpro.2020.100019.

W

Wang, B., and Shen, J. (2022). NF-κB Inducing Kinase Regulates Intestinal Immunity and Homeostasis. *Frontiers in Immunology* 13. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.895636 [Accessed March 31, 2023].

Wang, H., Zhang, C., Wu, G., Sun, Y., Wang, B., He, B., et al. (2015). Glutamine Enhances Tight Junction Protein Expression and Modulates Corticotropin-Releasing Factor Signaling in the Jejunum of Weanling Piglets. *The Journal of Nutrition* 145, 25–31. doi: 10.3945/jn.114.202515.

Wang, R. X., Lee, J. S., Campbell, E. L., and Colgan, S. P. (2020a). Microbiota-derived butyrate dynamically regulates intestinal homeostasis through regulation of actin-associated protein synaptopodin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117, 11648–11657. doi: 10.1073/pnas.1917597117.

Wang, S., Zhang, C., Yang, J., Wang, X., Wu, K., Zhang, B., et al. (2020b). Sodium Butyrate Protects the Intestinal Barrier by Modulating Intestinal Host Defense Peptide Expression and Gut Microbiota after a Challenge with Deoxynivalenol in Weaned Piglets. *J. Agric. Food Chem.* 68, 4515–4527. doi: 10.1021/acs.jafc.0c00791.

Wang, X., Tsai, T., Deng, F., Wei, X., Chai, J., Knapp, J., et al. (2019). Longitudinal investigation of the swine gut microbiome from birth to market reveals stage and growth performance associated bacteria. *Microbiome* 7, 109. doi: 10.1186/s40168-019-0721-7.

Wang, Y., Gunasekara, D. B., Reed, M. I., DiSalvo, M., Bultman, S. J., Sims, C. E., et al. (2017). A microengineered collagen scaffold for generating a polarized crypt-villus architecture of human small intestinal epithelium. *Biomaterials* 128, 44–55. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.03.005.

Wang, Y., Kim, R., Gunasekara, D. B., Reed, M. I., DiSalvo, M., Nguyen, D. L., et al. (2018). Formation of Human Colonic Crypt Array by Application of Chemical Gradients Across a Shaped Epithelial

Monolayer. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 5, 113–130. doi: 10.1016/j.jcmgh.2017.10.007.

Wang, Z., Li, J., Wang, Y., Wang, L., Yin, Y., Yin, L., et al. (2020c). Dietary vitamin A affects growth performance, intestinal development, and functions in weaned piglets by affecting intestinal stem cells. *Journal of Animal Science* 98, skaa020. doi: 10.1093/jas/skaa020.

Warschkau, D., Delgado-Betancourt, E., Holthaus, D., Müller, A., Kliem, G., Krug, S., et al. (2022). From 3D to 2D: Harmonization of Protocols for Two-dimensional Cultures on Cell Culture Inserts of Intestinal Organoids from Various Species. *BIO-PROTOCOL* 12. doi: 10.21769/BioProtoc.4295.

Wijtten, P. J. A., Meulen, J. van der, and Verstegen, M. W. A. (2011). Intestinal barrier function and absorption in pigs after weaning: a review. *British Journal of Nutrition* 105, 967–981. doi: 10.1017/S0007114510005660.

Williamson, I. A., Arnold, J. W., Samsa, L. A., Gaynor, L., DiSalvo, M., Cocchiaro, J. L., et al. (2018). A High-Throughput Organoid Microinjection Platform to Study Gastrointestinal Microbiota and Luminal Physiology. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 6, 301–319. doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.05.004.

Wilson, S. S., Tocchi, A., Holly, M. K., Parks, W. C., and Smith, J. G. (2015). A small intestinal organoid model of non-invasive enteric pathogen–epithelial cell interactions. *Mucosal Immunology* 8, 352–361. doi: 10.1038/mi.2014.72.

Wine, E., Gareau, M. G., Johnson-Henry, K., and Sherman, P. M. (2009). Strain-specific probiotic (Lactobacillus helveticus) inhibition of Campylobacter jejuni invasion of human intestinal epithelial cells. *FEMS Microbiology Letters* 300, 146–152. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01781.x.

X-Y

Xiao, Y., Wang, J., Wang, J., Wang, H., Wu, S., and Bao, W. (2022). Analysis of the roles of the Notch1 signalling pathway in modulating deoxynivalenol cytotoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 246, 114183. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.114183.

Yan, H., and Ajuwon, K. M. (2017). Butyrate modifies intestinal barrier function in IPEC-J2 cells through a selective upregulation of tight junction proteins and activation of the Akt signaling pathway. *PLOS ONE* 12, e0179586. doi: 10.1371/journal.pone.0179586.

Yang, Q., Bermingham, N. A., Finegold, M. J., and Zoghbi, H. Y. (2001). Requirement of Math1 for Secretory Cell Lineage Commitment in the Mouse Intestine. *Science* 294, 2155–2158. doi: 10.1126/science.1065718.

Yang, Q.-Y., Yang, Y.-L., Tang, Y.-X., Qin, P., Wang, G., Xie, J.-Y., et al. (2022). Bile acids promote the caveolae-associated entry of swine acute diarrhea syndrome coronavirus in porcine intestinal enteroids. *PLOS Pathogens* 18, e1010620. doi: 10.1371/journal.ppat.1010620.

Yano, T., Matsui, T., Tamura, A., Uji, M., and Tsukita, S. (2013). The association of microtubules with tight junctions is promoted by cingulin phosphorylation by AMPK. *Journal of Cell Biology* 203, 605–614. doi: 10.1083/jcb.201304194.

Yin, J., Wu, M. M., Xiao, H., Ren, W. K., Duan, J. L., Yang, G., et al. (2014). Development of an antioxidant system after early weaning in piglets2. *Journal of Animal Science* 92, 612–619. doi: 10.2527/jas.2013-6986.

Yin, L., Chen, J., Li, L., Guo, S., Xue, M., Zhang, J., et al. (2020). Aminopeptidase N Expression, Not Interferon Responses, Determines the Intestinal Segmental Tropism of Porcine Deltacoronavirus. *J. Virol.* 94. doi: 10.1128/JVI.00480-20.

Yoshikawa, T., Inoue, R., Matsumoto, M., Yajima, T., Ushida, K., and Iwanaga, T. (2011). Comparative expression of hexose transporters (SGLT1, GLUT1, GLUT2 and GLUT5) throughout the mouse gastrointestinal tract. *Histochem Cell Biol* 135, 183–194. doi: 10.1007/s00418-011-0779-1.

Z

Zanello, G., Berri, M., Dupont, J., Sizaret, P.-Y., D'Inca, R., Salmon, H., et al. (2011). Saccharomyces cerevisiae Modulates Immune Gene Expressions and Inhibits ETEC-Mediated ERK1/2 and p38 Signaling Pathways in Intestinal Epithelial Cells. *PLOS ONE* 6, e18573. doi: 10.1371/journal.pone.0018573.

Zeng, J., Jiang, J., Zhu, W., and Chu, Y. (2016). Heat-killed yogurt-containing lactic acid bacteria prevent cytokine-induced barrier disruption in human intestinal Caco-2 cells. *Ann Microbiol* 66, 171–178. doi: 10.1007/s13213-015-1093-2.

Zhang, D., Ji, H., Liu, H., Wang, S., Wang, J., and Wang, Y. (2016). Changes in the diversity and composition of gut microbiota of weaned piglets after oral administration of Lactobacillus or an antibiotic. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 10081–10093. doi: 10.1007/s00253-016-7845-5.

Zhang, M., Lv, L., Cai, H., Li, Y., Gao, F., Yu, L., et al. (2022). Long-Term Expansion of Porcine Intestinal Organoids Serves as an in vitro Model for Swine Enteric Coronavirus Infection. *Frontiers in Microbiology* 13. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.865336 [Accessed April 18, 2023].

Zheng, L., Duarte, M. E., Sevarolli Loftus, A., and Kim, S. W. (2021). Intestinal Health of Pigs Upon Weaning: Challenges and Nutritional Intervention. *Frontiers in Veterinary Science* 8. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2021.628258 [Accessed January 10, 2023].

Zhou, J.-Y., Huang, D.-G., Zhu, M., Gao, C.-Q., Yan, H.-C., Li, X.-G., et al. (2020). Wnt/β-catenin-mediated heat exposure inhibits intestinal epithelial cell proliferation and stem cell expansion through endoplasmic reticulum stress. *J Cell Physiol* 235, 5613–5627. doi: 10.1002/jcp.29492.

Zhu, C., Chen, Z., and Jiang, Z. (2016). Expression, Distribution and Role of Aquaporin Water Channels in Human and Animal Stomach and Intestines. *Int J Mol Sci* 17, 1399. doi: 10.3390/ijms17091399.

Zhu, L. H., Xu, J. X., Zhu, S. W., Cai, X., Yang, S. F., Chen, X. L., et al. (2014). Gene expression profiling analysis reveals weaning-induced cell cycle arrest and apoptosis in the small intestine of pigs1. *Journal of Animal Science* 92, 996–1006. doi: 10.2527/jas.2013-7551.

Zhu, M., Qin, Y., Gao, C., Yan, H., and Wang, X. (2020). L-Glutamate drives porcine intestinal epithelial renewal by increasing stem cell activity via upregulation of the EGFR-ERK-mTORC1 pathway. *Food Funct.* 11, 2714–2724. doi: 10.1039/C9FO03065D.

Ziegler, A., Gonzalez, L., and Blikslager, A. (2016). Large Animal Models: The Key to Translational Discovery in Digestive Disease Research. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2, 716–724. doi: 10.1016/j.jcmgh.2016.09.003.

Zietek, T., Giesbertz, P., Ewers, M., Reichart, F., Weinmüller, M., Urbauer, E., et al. (2020). Organoids to Study Intestinal Nutrient Transport, Drug Uptake and Metabolism – Update to the Human Model and Expansion of Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.577656 [Accessed March 6, 2023].

Zihni, C., Mills, C., Matter, K., and Balda, M. S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 564–580. doi: 10.1038/nrm.2016.80.

Abstract

In piglets, diarrhea is commonly observed after weaning and is associated with a dysfunction of the intestinal epithelial barrier. In the context of the reduction of antibiotics use in farms, new strategies are implemented to preserve the digestive health of piglets at weaning. The use of postbiotics (nutritional products derived from microorganisms) seems to be a promising strategy but their effects on the piglet intestinal epithelium are not well known. The objective of this thesis was to develop and characterize a model of piglet intestinal organoids allowing to test the effects of postbiotics targeting the barrier function of the intestinal epithelium. By culturing piglet intestinal epithelial stem cells in an extracellular matrix protein gel, we were able to obtain three-dimensional (3D) structures formed by a monolayer of polarized epithelial cells and including several cell types. We have built a biobank of 3D organoids from the jejunum and colon of suckling and weaned piglets (n = 12 per group). We have also developed a method to grow piglet intestinal organoids from cryopreserved epithelial crypts. Based on the expression analysis of 89 genes, we showed that piglet intestinal organoids partially retained the phenotype related to their original digestive segment while they did not maintain the specific gene expression profile of suckling or weaned piglets. Our analyses of the microbiota and metabolome of the piglet intestine from which the organoids originated suggest that more closely mimicking the luminal environment could help improve the physiological relevance of the organoids. Our characterization of 3D organoids confirmed that the apical side of epithelial cells is oriented towards the lumen and is therefore not easily accessible to study the effects of nutritional products. We then developed an organoid cell monolayer culture model that allows access to the apical side of the cells and to study the barrier function of the epithelium. Using this model, we tested the effects of three products derived from microorganisms: butyrate, a metabolite produced by the intestinal microbiota, and two postbiotics, one derived from yeast (YANG) and the other from bacteria (*Lactobacillus helveticus*). We showed that butyrate regulated the cell proliferation/differentiation balance, strengthened the epithelial barrier and modulated the expression of genes involved in innate immune responses, whereas the effects of the postbiotics YANG and *L. helveticus* were much less marked. These effects were highly dependent on the culture conditions mimicking or not the stem cell niche. We also studied these microorganism-derived products in the context of epithelial barrier dysfunction induced by the mycotoxin deoxynivalenol (DON). YANG and *L. helveticus* did not prevent the effects of DON while butyrate reduced or amplified some of its effects. Taken together, our results indicate that the piglet intestinal organoid model is useful for studying the physiology of the intestinal epithelium in a gut segment-specific manner. Cell monolayers derived from piglet intestinal organoids allow access to the apical side of the cells and can be used to demonstrate the effects of microorganism-derived products on the epithelial barrier. These new tools can be used in many contexts to study *in vitro* the porcine digestive epithelium for veterinary and biomedical research.

Key words: piglet, weaning, intestinal epithelium, organoids, monolayer, postbiotics, butyrate

Résumé

Chez le porcelet, des diarrhées sont couramment observées après le sevrage et sont associées à une dysfonction de la barrière épithéliale intestinale. Dans le contexte de la réduction de l'utilisation des antibiotiques en élevage, de nouvelles stratégies sont mises en place pour préserver la santé digestive des porcelets lors du sevrage. Parmi celles-ci, l'utilisation de postbiotiques (produits nutritionnels dérivés de micro-organismes) semble être une stratégie prometteuse mais leurs effets sur l'épithélium intestinal du porcelet sont peu connus. Ce travail de thèse avait pour objectif de développer et caractériser un modèle de culture d'organoïdes d'intestin de porcelets permettant de tester les effets de postbiotiques ciblant la fonction de barrière de l'épithélium intestinal. La mise en culture de cellules souches épithéliales intestinales de porcelets dans un gel de protéines de matrice extracellulaire nous a permis d'obtenir des structures tridimensionnelles (3D) formées d'une monocouche de cellules épithéliales polarisées et comprenant plusieurs types cellulaires. Nous avons constitué une biobanque d'organoïdes 3D de jéjunum et de côlon de porcelets allaités ou sevrés (n = 12 par condition). Nous avons également mis au point une méthode permettant de cultiver des organoïdes d'intestin de porcelets à partir de cryptes épithéliales cryoconservées. Sur la base de l'analyse de l'expression de 89 gènes, nous avons montré que les organoïdes d'intestin de porcelets conservaient en partie le phénotype lié à leur segment digestif d'origine alors qu'ils ne maintenaient pas le profil d'expression de gènes spécifique des porcelets allaités ou sevrés. Nos analyses de microbiote et de métabolome de l'intestin des porcelets à l'origine des organoïdes suggèrent que reproduire plus fidèlement l'environnement luminal pourrait contribuer à améliorer la pertinence physiologique des organoïdes. Notre caractérisation des organoïdes cultivés en 3D a confirmé que le pôle apical des cellules épithéliales est orienté vers leur lumière et n'est donc pas facilement accessible pour étudier les effets de produits nutritionnels. Nous avons alors mis au point un modèle de culture de monocouches de cellules d'organoïdes permettant d'avoir accès au pôle apical des cellules et d'étudier la fonction de barrière de l'épithélium. Grâce à ce modèle, nous avons testé les effets de trois produits dérivés de micro-organismes : le butyrate, un métabolite produit par le microbiote intestinal et deux postbiotiques, l'un dérivé de levures (YANG) et l'autre dérivé de bactéries (*Lactobacillus helveticus*). Nous avons montré que le butyrate régulait l'équilibre prolifération/différenciation cellulaire, renforçait la barrière épithéliale et modulait l'expression de gènes impliqués dans les réponses immunitaires innées alors que les effets des postbiotiques YANG et *L. helveticus* étaient nettement moins marqués. Ces effets dépendaient fortement des conditions de culture mimant ou non la niche des cellules souches. Nous avons également étudié ces produits dérivés de micro-organismes dans le contexte d'une dysfonction de la barrière épithéliale induite par la mycotoxine déoxynivalénol (DON). Le YANG et *L. helveticus* n'ont pas prévenu les effets du DON alors que le butyrate a réduit ou amplifié certains de ses effets. L'ensemble de nos résultats indiquent que le modèle des organoïdes intestinaux de porcelet est utile pour étudier la physiologie de l'épithélium intestinal d'une manière spécifique aux segments intestinaux. Les monocouches de cellules d'organoïdes d'intestin de porcelet permettant l'accès au pôle apical des cellules peuvent être utilisées pour mettre en évidence les effets de produits dérivés de micro-organismes sur la barrière épithéliale. Ces nouveaux outils pourront être utilisés dans de nombreux contextes pour étudier *in vitro* l'épithélium digestif porcin pour la recherche vétérinaire et biomédicale.

Mots clés : porcelet, sevrage, épithélium intestinal, organoïdes, monocouches, postbiotiques, butyrate