



**HAL**  
open science

# Les organoïdes intestinaux des animaux de rente : de nouveaux modèles de culture in vitro pour une meilleure compréhension du fonctionnement de l'intestin

Agnès Wiedemann, Sonia Lacroix-Lamandé

## ► To cite this version:

Agnès Wiedemann, Sonia Lacroix-Lamandé. Les organoïdes intestinaux des animaux de rente : de nouveaux modèles de culture in vitro pour une meilleure compréhension du fonctionnement de l'intestin. INRAE Productions Animales, 2023, 36 (2), pp.7562. 10.20870/productions-animales.2023.36.2.7562 . hal-04019991

**HAL Id: hal-04019991**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04019991>**

Submitted on 8 Mar 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

# 1 Les organoïdes intestinaux des animaux 2 de rente : de nouveaux modèles de 3 culture *in vitro* pour une meilleure 4 compréhension du fonctionnement de 5 l'intestin

6  
7 *Agnès Wiedemann<sup>1,2</sup> et Sonia Lacroix-Lamandé<sup>1</sup>*

8  
9 <sup>1</sup> INRAE, Université de Tours, ISP, 37380 Nouzilly, France

10 <sup>2</sup> IRSD - Institut de Recherche en Santé Digestive, Université de Toulouse, INSERM, INRAE,  
11 ENVY, UPS, Toulouse, France

12  
13  
14 Courriel : [sonia.lamande@inrae.fr](mailto:sonia.lamande@inrae.fr)

## 15 **Résumé**

16  
17 L'intestin est un organe complexe aux fonctions multiples. En effet, il participe à la  
18 digestion et l'absorption des nutriments et protège l'individu des agressions par des agents  
19 pathogènes intestinaux en assurant un rôle de barrière. L'étude de ce compartiment digestif  
20 reste toutefois limitée par l'accès aux tissus que ce soit chez l'Homme ou l'animal.

21 Dans ce contexte, le développement d'organoïdes intestinaux à partir de cellules  
22 souches représente une avancée technologique importante dans l'étude de la physiopathologie  
23 intestinale. De plus, cet outil permet de répondre à une demande sociétale visant à réduire  
24 l'usage d'animaux modèles pour la recherche et s'inscrit dans la démarche des 3Rs  
25 (Remplacement, Réduction et Raffinement).

26 L'objectif de cette revue est, à partir de rappels de la fonction digestive, de faire un état  
27 des lieux sur les différents types d'organoïdes intestinaux existants dérivés d'animaux de rente  
28 et de discuter leurs avantages, leurs limites et surtout leur application.

## 31 **Abstract**

32  
33 **Intestinal organoids of farm animals: new in vitro models for a better understanding of**  
34 **intestinal functions.**

35  
36  
37 The intestine is a complex organ with multiple functions. Indeed, it participates in the digestion  
38 and absorption of nutrients and protects the host from enteropathogen attack by providing a

39 barrier function. However, the study of this digestive compartment remains limited due to  
 40 access to human or animal tissues.

41 In this context, the development of intestinal organoids derived from stem cells represents an  
 42 important technological advance in the study of intestinal physiopathology. In addition, this  
 43 tool makes it possible to respond to a societal demand aiming at reducing the use of animal  
 44 models in research and is part of the 3R's principle (Replacement, Reduction and Refinement).  
 45 The objective of this review is, from reminders of the digestive function, to make an inventory  
 46 of the different types of existing intestinal organoids derived from farm animals and to discuss  
 47 their advantages, their limits and especially their application.

48

## 49 **Chapeau**

50 Les organoïdes intestinaux sont des structures cellulaires tridimensionnelles obtenues *in vitro*  
 51 après auto-organisation des cellules souches cultivées avec des facteurs de croissance et de  
 52 différenciation adéquats. Ces nouveaux modèles cellulaires récapitulent l'architecture et les  
 53 types cellulaires de l'épithélium intestinal et conservent des fonctions similaires (Hofer and  
 54 Lutolf 2021). Ils offrent donc un outil intéressant pour la caractérisation de mécanismes  
 55 impliqués dans la physiopathologie de l'épithélium intestinal et ses interactions avec des  
 56 pathogènes entériques retrouvés chez les animaux d'élevage<sup>1</sup>.

## 57 **Introduction**

58

59 Ces dernières années, les avancées scientifiques sur les cellules souches et en bio-ingénierie ont  
 60 permis de révolutionner la culture cellulaire avec un changement de dimensions de 2 (2D) à 3  
 61 (3D) pour améliorer la pertinence physiologique des études « *in vitro* ». Ainsi sont nés les  
 62 « organoïdes », ou mini-organes, qui permettent aujourd'hui de pouvoir reproduire au plus  
 63 proche de la réalité la physiologie du cerveau, du foie, des intestins etc. de l'Homme. Leur  
 64 utilisation représente un grand intérêt en recherche pour évaluer l'efficacité et la toxicité de  
 65 molécules pharmaceutiques, pour étudier les infections, et pour la médecine régénérative/la  
 66 transplantation d'organes.

67

68 Le développement d'organoïde est initié par la mise en culture de cellules souches ayant des  
 69 propriétés uniques d'auto-renouvellement et de différenciation. Selon leur origine, on  
 70 distingue les cellules souches embryonnaires (ESC pour *embryonic stem cell*) pluripotentes,  
 71 les cellules souches adultes ou tissulaires multipotentes, et celles obtenues par  
 72 reprogrammation somatique, dites cellules souches pluripotentes induites (iPSCs pour

---

<sup>1</sup> Cette synthèse a fait l'objet d'une présentation : Lacroix-Lamandé S., Wiedemann, A, 2021. Etude *ex vivo* des interactions hôte-pathogènes au moyen de cultures d'organoïdes dérivés de cryptes intestinales. 6ème journée thématique de Biotechnocentre « Cellules souches et organoïdes : réalités et perspectives » 25 juin 2021, et d'une publication, Beaumont, M., F. Blanc, C. Cherbuy, G. Egidy, E. Giuffra, S. Lacroix-Lamandé, and A. Wiedemann. 2021. 'Intestinal organoids in farm animals', *Vet Res*, 52: 33.

73 *induced pluripotent stem cell*) (Pain 2021). Elles sont cultivées dans des milieux contenant  
 74 divers facteurs de croissance, inhibiteurs de mort cellulaire et des facteurs de différenciation  
 75 spécifiques des tissus et dans une matrice cellulaire proche de celle existant *in vivo* avec des  
 76 laminines et du collagène leur permettant de s'auto-organiser non pas étalées au fond d'une  
 77 boîte de Pétri, mais en 3D.

78  
 79 Les organoïdes intestinaux font partie des outils de culture cellulaire 3D les plus développés et  
 80 étudiés à l'heure actuelle. En effet, l'amélioration des connaissances des voies de signalisation  
 81 impliquées dans le maintien et la prolifération des cellules souches intestinales qui expriment  
 82 spécifiquement  $Lgr5^+$ , un récepteur orphelin à 7 domaines transmembranaire, a permis le  
 83 développement rapide des organoïdes intestinaux chez la souris et l'homme (Sato et al. 2009;  
 84 Sato, Stange, et al. 2011). Ils peuvent être générés *in vitro* à partir des cellules souches des  
 85 différents segments de l'intestin et conservent ainsi toutes les caractéristiques phénotypiques et  
 86 fonctionnelles de leurs tissus d'origine. On appellera alors « entéroïdes » les organoïdes  
 87 intestinaux dérivés de l'intestin grêle et « colonoïdes » ceux dérivés du côlon (Stelzner et al.  
 88 2012). Ces structures 3D auto-organisées sont composées d'une monocouche de cellules  
 89 épithéliales intestinales polarisée qui récapitule *in vitro* la composition multicellulaire de  
 90 l'épithélium intestinal et son architecture avec des domaines cryptiques. Ces « mini intestins »  
 91 reproduisent également leurs principaux rôles tels que l'absorption des nutriments et la fonction  
 92 barrière (Sato et al. 2009).

93  
 94 Chez les animaux de rente, quatre revues internationales récentes ont décrit tous les travaux  
 95 réalisés à partir d'organoïdes intestinaux de différents animaux de ferme et les particularités des  
 96 milieux de culture de chaque modèle cellulaire (Seeger 2020; Beaumont et al. 2021; Lacroix-  
 97 Lamandé S., Wiedemann, A, 2021 ; Kar et al. 2021; Holthaus et al. 2020). Dans cette revue,  
 98 nous décrirons la composition de l'épithélium intestinal pour mieux comprendre comment la  
 99 technologie des organoïdes intestinaux a pu se développer. Un état des lieux des différents  
 100 modèles d'organoïdes intestinaux des animaux de rente fera l'objet d'une autre partie de cette  
 101 revue pour finir sur quelques applications actuelles et futures de ces outils innovants (Tableau  
 102 1). Ils ouvrent donc de nouvelles perspectives dans la recherche animale et répondent à une  
 103 demande sociétale de limiter l'utilisation des animaux en recherche. C'est pourquoi, un collectif  
 104 de scientifiques, chercheurs et ingénieurs de INRAE, s'approprient actuellement ces nouvelles  
 105 méthodologies et ont constitué un groupe de travail (GT Organoïde INRAE) pour échanger et  
 106 progresser plus efficacement sur cette technologie.

107  
 108  
 109  
 110  
 111  
 112  
 113  
 114  
 115

116

117

Espèce	Segment	Application	Référence
Porc	Duodenum	Stimulation avec du LPS Edition de génome	(Koltes and Gabler 2016) (Engevik et al. 2020)
	Jejunum	Identification des types cellulaires Culture 2D et transcriptomique	(Gonzalez et al. 2013) (van der Hee et al. 2018; van der Hee et al. 2020; Hoffmann et al. 2021)
		Stimulation avec des Mycotoxines, Stress thermique Infection par le Swine enteric virus, S. Typhimurium and <i>T. gondii</i>	(Li, Zhu, et al. 2019; Zhou et al. 2020) (Li et al. 2020; Derricott et al. 2019)
		Supplémentation en cuivre	(Yin et al. 2021)
	Ileum	Modèle de développement de l'intestin	(Powell and Behnke 2017; Ferrandis Vila et al. 2018)
Supplémentation en Vitamine A Infection par <i>Lawsonia intracellularis</i>		(Wang et al. 2020) (Resende et al. 2020)	
	Duodenum, Jejunum, Ileum, Colon	Infection par le virus Porcine epidemic diarrhea virus	(Li, Fu, et al. 2019)
Poulet	Caecum, jejunum	Modèle de développement de l'intestin	(Powell and Behnke 2017; Li et al. 2018)
	Intestin grêle	Traitements Chimiques	(Acharya et al. 2020)
	Intestin grêle, embryon	Modèle de développement de l'intestin, Stimulation par des agonistes de TLR et <i>Lactobacillus acidophilus</i> , Infection par <i>Eimeria</i> , <i>Salmonella</i> et <i>Influenza</i>	(Panek, Grabacka, and Pierzchalska 2018; Pierzchalska et al. 2017; Pierzchalska et al. 2012; Pierzchalska et al. 2019; Nash et al. 2021; Orr et al. 2021)
Bovin	Jejunum	Infection par <i>S. Typhimurium</i> and <i>T. gondii</i> Modèle de développement de l'intestin	(Derricott et al. 2019) (Lee et al. 2021)
	Ileum	Modèle de développement de l'intestin	(Hamilton et al. 2018; Powell and Behnke 2017)
		Infection par <i>E. coli</i> , <i>Rotavirus</i>	(Fitzgerald et al. 2019; Alfajaro et al. 2019)
Colon	Culture 2D, cryoconservation	(Topfer et al. 2019)	
Mouton	Ileum	Modèle de développement de l'intestin	(Powell and Behnke 2017)
Cheval	Ileum, jejunum	Modèle de développement de l'intestin	(Powell and Behnke 2017; Stewart, Freund, and Gonzalez 2018)
Lapin	Caecum	Modèle de développement de l'intestin et 2D	(Mussard et al. 2020; Kardia et al. 2021)

118

119

120

121

 122 [Tableau 1. Etat des lieux des organoïdes intestinaux des animaux de rente.](#)

 123 *Tableau adapté de* Beaumont et al., 2021.

124

125

126

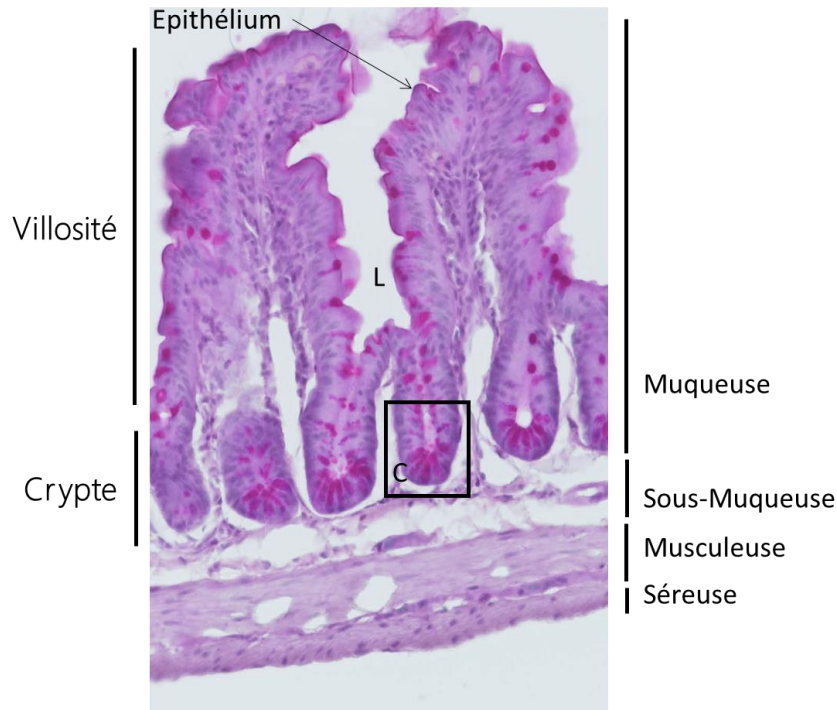
## 127 **1. Le tractus gastro-intestinal**

### 128 **1.1. Structure et fonctions du tube digestif**

129

130 Différents compartiments constituent le tractus intestinal depuis la bouche jusqu'à l'anus :  
 131 l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle lui-même subdivisé en 3 compartiments (duodénum,  
 132 jéjunum et iléon), le caecum, le côlon et le rectum. Le duodénum reçoit le chyme alimentaire,  
 133 le suc biliaire et les sécrétions pancréatiques pour compléter la digestion chimique. Le jéjunum  
 134 est le site principal d'absorption des nutriments tandis que l'iléon absorbe les nutriments  
 135 résiduels, les vitamines et les acides biliaires conjugués. Le gros intestin est composé du caecum  
 136 et du côlon, dont les fonctions principales sont d'absorber l'eau, les électrolytes et les produits  
 137 de fermentation microbienne.

138 Tous ces organes ont la même origine embryonnaire mais exercent des fonctions spécifiques à  
 139 leur localisation pour permettre la digestion des aliments, la fonction première attribuée à  
 140 l'intestin. L'intestin joue également un rôle de barrière en permettant le passage spécifique des  
 141 nutriments lors de la digestion et en prévenant celui de pathogènes. Il est constitué de 4 couches  
 142 successives permettant d'assurer l'ensemble de ses fonctions (Figure 1). La couche la plus  
 143 externe du tube est appelée la séreuse, elle est accolée à la musculuse qui est composée de  
 144 muscles lisses longitudinaux et circulaires et d'un système nerveux entérique (SNE) essentiel à  
 145 la fonction de motricité intestinale pour l'élimination du bol alimentaire. La 3<sup>ème</sup> couche  
 146 correspond à la sous-muqueuse. Elle est constituée de tissu conjonctif lâche contenant des  
 147 vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que les neurones et cellules gliales du SNE. La  
 148 dernière couche appelée muqueuse est constituée d'un épithélium en contact direct avec la  
 149 lumière digestive et d'un système immunitaire appelé GALT pour Gut associated lymphoid  
 150 tissue. L'épithélium constitue une barrière physique entre l'organisme et le milieu extérieur. A  
 151 cette interface se localise le microbiote intestinal jouant également un rôle important dans la  
 152 digestion et dans la protection de l'hôte.



153

154 Figure 1. Coupe Histologique représentant la paroi de l'intestin grêle.

155 *L'intestin est un tube creux constitué de quatre couches: la muqueuse, la sous muqueuse, la*  
156 *musculaire et la séreuse. L : lumière intestinale ; C : crypte*

157

158

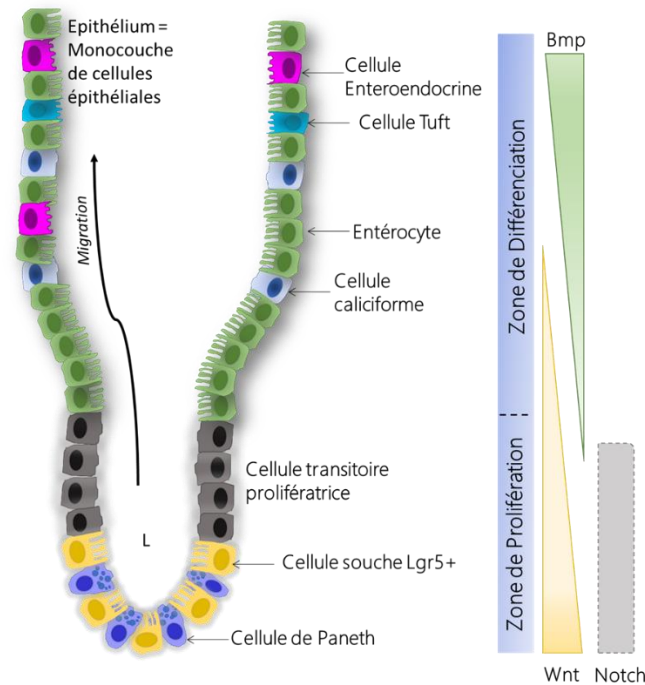
## 159 1.2. Composition de l'épithélium intestinal

160

161 L'épithélium intestinal est composé de villosités et de cryptes (Figure 1 et 2). Il est formé d'une  
162 monocouche de cellules épithéliales différenciées ou prolifératrices situées à l'interface entre  
163 milieu extérieur (lumière intestinale) et l'hôte. Les cellules épithéliales différenciées assurent  
164 des fonctions de digestion et de défenses physique, en formant une barrière, et immunologique  
165 en produisant des agents anti-microbiens et des cytokines ou chimiokines. Les cellules  
166 épithéliales en prolifération assurent le renouvellement de l'épithélium qui se produit tous les  
167 3 à 5 jours. La balance entre la prolifération et la différenciation doit être maintenue et finement  
168 régulée pour assurer l'homéostasie de l'épithélium intestinal. Cet équilibre est contrôlé par des  
169 gradients d'activations spécifiques des grandes voies de signalisation (Wnt, Notch, Bmp)  
170 Figure 2.

171

172



173

174 Figure 2. Composition de l'épithélium intestinal.

175 *L'intestin est un tube recouvert de villosités elles-mêmes recouvertes d'un épithélium monocouche.*  
 176 *Différents types de cellules épithéliales composent cet épithélium. Dans les cryptes intestinales, se*  
 177 *trouvent les cellules souches Lgr5+ qui prolifèrent et migrent le long de l'axe crypto-villositaire pour*  
 178 *se différencier en cellules absorbantes que sont les entérocytes ou en cellules sécrétrices telles que les*  
 179 *cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines et les cellules Tuft. Les cellules de Paneth sont elles*  
 180 *aussi des cellules différenciées mais ne migrent pas, elles restent localisées dans les cryptes et*  
 181 *constituent une niche pour les cellules souches. La prolifération des cellules ou leur différenciation*  
 182 *implique une régulation fine des voies de signalisation. Ainsi, la voie Wnt est fortement active dans*  
 183 *les cryptes et favorise la prolifération et le maintien des cellules prolifératives. La voie Bmp est active*  
 184 *dans les villosités et permet la différenciation des cellules. La voie Notch est active dans les cryptes*  
 185 *au niveau des cellules progénitrices absorbantes et des cellules souches et permet notamment le choix*  
 186 *du lignage de différenciation (cellules absorbante ou sécrétrice) et le maintien de la prolifération.*

187

188

### 189 a. Les villosités

190

191 Les cellules spécialisées ou différenciées, recouvrent les villosités dans l'intestin grêle, et se  
 192 positionnent dans le tiers supérieur des cryptes dans le côlon. Il existe 5 types de cellules  
 193 différenciées dans l'intestin appartenant à deux grands lignages cellulaires dans cet épithélium:  
 194 le type absorbant, représenté par les entérocytes, et le type sécrétoire, auquel correspondent les  
 195 cellules de Paneth, les cellules caliciformes, les cellules entéro-endocrines et les cellules Tuft  
 196 ou « touffues ». Les entérocytes représentent 80% des cellules de l'épithélium et ont un rôle  
 197 dans l'absorption des nutriments. Les cellules entéro-endocrines sont moins nombreuses (1%)  
 198 et sont spécialisées dans la sécrétion de peptides et d'hormones (telles que la sérotonine, les  
 199 catécholamines, l'adrénaline, l'enteroglucagon, du peptide YY et bien d'autres...) pour agir sur  
 200 la mobilité intestinale et les fonctions digestives. Elles sont stimulées par les produits de  
 201 digestions (glucose, acides-aminés...) et les produits de de fermentation du microbiote tels que



202 les acides gras à chaîne courte (de l'anglais SCFA (short-Chain Fatty Acids). De par leur  
 203 fonction, elles sont plus nombreuses en partie proximale de l'intestin grêle et les peptides et les  
 204 hormones qu'elles produisent sont différentes selon leur localisation (Gribble and Reimann  
 205 2019). La fonction de protection est principalement assurée par les cellules de Paneth qui  
 206 sécrètent des peptides antimicrobiens et les cellules caliciformes qui représentent 5% des  
 207 cellules épithéliales spécialisées dans la sécrétion du mucus. Les cellules « touffues » appelées  
 208 ainsi de par leur aspect en microscopie électronique à balayage, ont plus récemment été décrites  
 209 et participent à l'immunité antiparasitaire (Figure 2). Tous ces types de cellules épithéliales  
 210 intestinales différenciées dérivent des cellules souches épithéliales intestinales situées à la base  
 211 des cryptes épithéliales. Ils acquièrent leur spécificité en se différenciant le long de l'axe crypto-  
 212 villositaire (Gehart and Clevers 2019). En revanche, les cellules de Paneth restent au fond des  
 213 cryptes et participent également au maintien de la niche des cellules progénitrices et des cellules  
 214 souches Lgr5<sup>+</sup> (Sato, van Es, et al. 2011). La distribution des types de cellules épithéliales  
 215 diffère également le long de l'intestin, ce qui reflète la spécialisation fonctionnelle des segments  
 216 digestifs (Middendorp et al. 2014).

217

## 218 **b. Les cryptes ou niches des cellules souches**

219

220 Dans les cryptes intestinales, les cellules souches sont appelées les CBC pour *crypt base*  
 221 *columnar cell* et expriment le récepteur Lgr5. Ces cellules prolifèrent activement et possèdent  
 222 les caractéristiques typiques des cellules souches dans un environnement privilégié appelé  
 223 « niche ». À chaque division, elles engendrent des cellules progénitrices qui s'amplifient, puis  
 224 se différencient dans les différents types cellulaires de l'épithélium intestinal (Seishima and  
 225 Barker 2019).

226

227 La signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine participe au contrôle de la prolifération, au maintien des  
 228 cellules souches, et au renouvellement de l'épithélium intestinal (van der Hee et al. 2020;  
 229 Randall, Turton, and Foster 2011). Si les cellules souches génèrent leur propre niche qui leur  
 230 assure, par un effet paracrine, un rôle protecteur et instructeur, les cellules avoisinantes telles  
 231 que les cellules épithéliales adjacentes (cellules de Paneth), les myofibroblastes, les neurones  
 232 entériques, les cellules endothéliales, les lymphocytes intraépithéliaux et les macrophages  
 233 participent également à cette « niche ». Dans cette niche sont sécrétés des facteurs activant la  
 234 voie Wnt tels que Wnt3a, de l'EGF (epidermal growth factor), des ligands des récepteurs Notch  
 235 pour favoriser la prolifération, et du TGF- $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ ) (Sato, van Es, et al.  
 236 2011).

237

## 238 **2. Les modèles *in vitro* pour étudier l'intestin des animaux de rente**

239

240 Etudier les fonctions de l'épithélium intestinal chez les espèces animales a des implications  
 241 majeures en recherche que ce soit pour l'amélioration de l'efficacité alimentaire des animaux,  
 242 pour la santé vétérinaire en décryptant les interactions entre l'intestin des animaux et les agents  
 243 pathogènes entériques ou encore pour la recherche biomédicale avec l'utilisation des animaux

244 en tant que modèle de maladies humaines. Les modèles couramment utilisés pour étudier  
 245 l'épithélium intestinal des animaux sont les lignées cellulaires de cellules épithéliales  
 246 immortalisées. Ces lignées sont disponibles chez le porc (IPEC-J2, dérivées du jéjunum ou  
 247 PoCo83-3 dérivé du colon) mais n'existent pas pour d'autres espèces animales comme le poulet  
 248 et le bovin. De plus, elles présentent l'inconvénient majeur de ne pas représenter l'hétérogénéité  
 249 cellulaire de l'épithélium et par conséquent ne reproduisent pas entièrement la fonctionnalité  
 250 des tissus (Vergauwen 2015; van der Hee et al. 2020). La culture *ex vivo* d'explants intestinaux  
 251 ou de cellules épithéliales intestinales primaires récapitule les principales caractéristiques du  
 252 tissu *in vivo*, mais elle ne convient pas aux expériences de longue durée en raison de la viabilité  
 253 limitée à environ 24 ou 48h (Randall, Turton, and Foster 2011). Le développement récent des  
 254 organoïdes intestinaux des animaux de rente résout la plupart de ces limitations. Une revue  
 255 récente décrit les progrès réalisés pour les études *in vitro* de l'intestin chez l'Homme depuis  
 256 l'utilisation des lignées cellulaires jusqu'aux organoïdes cultivés sur puce (décrits à la fin de la  
 257 revue) (Rahman et al. 2021).  
 258

### 259 3. Les organoïdes intestinaux des animaux de rente

#### 260 3.1. Les cellules souches pour cultiver des organoïdes pluripotentes

261  
 262 Les organoïdes sont cultivés à partir de cellules souches ayant des propriétés d'auto-  
 263 renouvellement et de différenciation leur permettant de générer l'ensemble des cellules de  
 264 l'organisme. Trois types de cellules souches sont généralement utilisées pour dériver des  
 265 organoïdes : les cellules souches à pluripotence induite (iPSC) (des cellules somatiques  
 266 reprogrammées génétiquement pour les rendre pluripotentes) ou les cellules souches  
 267 embryonnaires (ESC) ou encore les cellules souches multipotentes isolées de tissus. Malgré les  
 268 progrès récents pour le développement de cellules iPSC des animaux domestiques (Bogliotti et  
 269 al. 2018; Sato and Clevers 2013), à notre connaissance, tous les modèles organoïdes intestinaux  
 270 d'espèces animales ont été développés avec les cellules souches isolées de tissus.  
 271

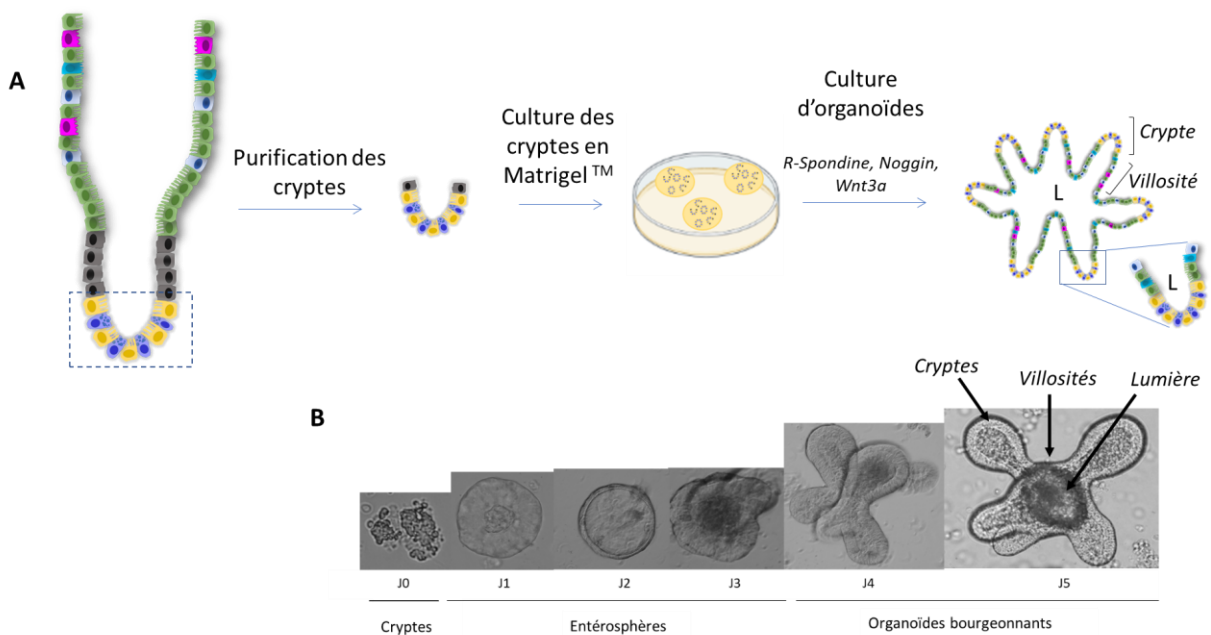
#### 272 3.2. Culture des organoïdes intestinaux

273  
 274 La culture d'organoïde intestinal est basée sur la reproduction de la niche des cellules souches  
 275 *in vitro*. Ainsi, le milieu de culture des organoïdes contient des facteurs permettant de stimuler  
 276 la voie Wnt (Wnt3a et R-Spondin), de l'EGF important pour la prolifération des cellules  
 277 souches et du Noggin pour inhiber la signalisation Bmp. Grâce à ces facteurs, les organoïdes  
 278 croissent et forment au bout de quelques jours des mini-intestins regroupant toutes les cellules  
 279 différenciées de l'épithélium intestinal. Lorsque des cellules souches d'intestin grêle sont  
 280 cultivées, des bourgeons contenant des cellules souches ainsi que des cellules de Paneth se  
 281 forment et reproduisent l'architecture des cryptes (Figure 3). Les cellules différenciées se  
 282 retrouvent hors des cryptes dans des domaines récapitulant l'organisation des villosités. Pour  
 283 obtenir la structure 3D des organoïdes, les cellules souches épithéliales intestinales sont

284 généralement ensemencées dans du Matrigel™, un gel de protéines de la matrice extracellulaire  
285 contenant des facteurs de croissance.

286  
287 Les organoïdes intestinaux humains et murins sont dérivés des cellules souches isolées de tissus  
288 intestinaux ou de cellules souches pluripotentes induites ou de cellules souches embryonnaires  
289 (Gao et al. 2019). Ces méthodes ont récemment été adaptées à de nombreuses espèces  
290 agronomiques, notamment le porc, le lapin, le bovin, le mouton, le cheval et le poulet (Figure  
291 4 et Tableau 1) (Panek, Grabacka, and Pierzchalska 2018). Les modèles organoïdes intestinaux  
292 n'ont pas encore été développés pour les poissons. Des organoïdes intestinaux d'animaux de  
293 ferme ont été obtenus avec succès à partir de plusieurs segments digestifs (duodénum, jéjunum,  
294 iléon, caecum et côlon).

295  
296



297

298 Figure 3. Génération et culture d'organoïdes intestinaux.

299 *Les organoïdes intestinaux sont générés à partir des cellules souches intestinales. Que ce soit pour*  
300 *l'Homme ou l'animal, celles-ci peuvent être purifiées à partir de cryptes isolées de fragments*  
301 *d'intestin ou de biopsies. Elles sont ensuite mises en culture avec des facteurs de croissance adaptés*  
302 *et dans une matrice leur permettant une croissance en 3D. (A) Schéma de protocole expérimental*  
303 *pour obtenir des organoïdes intestinaux en culture. (B) Images de microscopie optique illustrant le*  
304 *développement au cours du temps des organoïdes intestinaux en culture à partir d'ensemencement*  
305 *de cellules de cryptes intestinales.*

306

307

### 308 a. Isolement des cellules souches intestinales

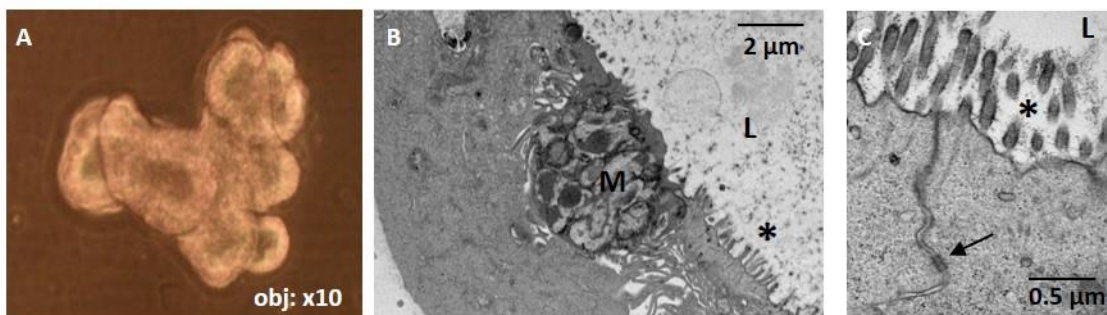
309

310 La première étape de la culture d'organoïdes intestinaux des animaux de rente consiste à isoler  
311 les cryptes intestinales contenant les cellules souches avec des protocoles proches de ceux  
312 utilisés pour l'Homme et la souris. A partir du prélèvement d'intestin du segment désiré, des  
313 étapes d'incubation et d'agitation avec des tampons de dissociation généralement à base d'acide

314 éthylènediaminetétraacétique (EDTA) et du dithiothréitol (DTT) sont réalisées. Selon les  
315 espèces et les segments digestifs, la concentration en EDTA varie énormément de même que le  
316 temps et la température d'incubation. Dans certains cas, un inhibiteur de la mort des cellules  
317 épithéliales, le Y27632, est ajouté lors de la purification. Les cryptes isolées sont ensuite  
318 ensemencées dans du Matrigel™ et le milieu de croissance est ajouté.  
319

### 320 **b. Mise en Culture des cryptes intestinales**

321  
322 Face à la diversité des facteurs nécessaires à la culture des organoïdes, la difficulté à obtenir  
323 des molécules recombinantes spécifiques de chacune des espèces animales étudiées aurait pu  
324 constituer un frein au développement de ces nouveaux modèles de culture. Toutefois, la  
325 conservation évolutive élevée des séquences en acides aminés des facteurs de croissances entre  
326 les espèces animales a rendu possible la culture d'organoïdes intestinaux à partir de facteurs  
327 humains ou murins (Panek, Grabacka, and Pierzchalska 2018; Mussard et al. 2020). Ainsi, de  
328 très nombreuses études rapportent l'utilisation du milieu conditionné de cellules L-WRN  
329 (lignée cellulaire L de souris sécrétant Wnt3a, R-spondin et Noggin, ATCC® CRL-3276™)  
330 pour cultiver des organoïdes intestinaux de plusieurs espèces comme le poulet et le lapin  
331 (Panek, Grabacka, and Pierzchalska 2018; Mussard et al. 2020). Comme décrit précédemment,  
332 le développement des organoïdes intestinaux à partir des cellules souches est possible en  
333 inhibant la signalisation de la voie Bmp par le Noggin, en stimulant la prolifération des cellules  
334 souches épithéliales par la R-Spondin et la protéine Wnt3a, cette dernière participant également  
335 à la différenciation des cellules épithéliales. Pour faciliter la croissance des organoïdes  
336 intestinaux, le milieu peut également contenir de l'EGF, ou des suppléments de culture cellulaire  
337 tels que des vitamines ou des mélanges complexes commercialisés tels que les suppléments N2  
338 et B27.  
339  
340  
341



342  
343 **Figure 4: Organoïdes intestinaux dérivés de cryptes jéjunales de poulet cultivés en milieu L-**  
344 **WRN.**

345 *(A) Image de microscopie optique d'organoïde mature en culture. (B-C) Caractérisation du modèle*  
346 *organoïde intestinal aviaire par microscopie électronique à transmission. La face luminale (L) de*  
347 *l'organoïde est apparente dont la surface est décorée d'une bordure en brosse (visualisée avec un*  
348 *astérisque). M indique une cellule à mucus qui fait face à la lumière et la flèche indique les jonctions*  
349 *intercellulaires caractéristiques de l'organisation polarisée des cellules.*  
350

351 En absence de molécules recombinantes spécifiques d'espèce, une autre approche a été de  
 352 cultiver des organoïdes intestinaux de porc et de bovin avec du milieu de croissance commercial  
 353 optimisé par STEMCELL Technologies (Vancouver, Canada) pour la souris et les organoïdes  
 354 humains (Li, Zhu, et al. 2019; Derricott et al. 2019; Li, Fu, et al. 2019).

355 Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs ou d'activateurs synthétiques des voies de signalisation  
 356 essentielles à la physiologie intestinale est également un moyen de s'affranchir de la  
 357 disponibilité des molécules recombinantes. Ainsi l'inhibiteur CHIR99021 peut être utilisé pour  
 358 inhiber la glycogène synthase kinase 3 et ainsi activer la voie Wnt dans la culture d'organoïdes  
 359 intestinaux de porc, bovin, cheval et lapin (Zhou et al. 2020; Derricott et al. 2019; Stewart,  
 360 Freund, and Gonzalez 2018; Mussard et al. 2020). Dans plusieurs études, la prolifération  
 361 épithéliale et l'inhibition de la différenciation ont été facilitées par les inhibiteurs du récepteur  
 362 TGF $\beta$  (LY2157299, A8301, SB43542) et l'inhibiteur de p38 MAPK SB202190 (Holmberg et  
 363 al. 2017). Enfin, il est possible de remplacer le Noggin par l'inhibiteur de la voie Bmp  
 364 LDN193189 comme cela a été décrit pour la culture d'organoïdes de caecum de lapin (Mussard  
 365 et al. 2020). Un autre inhibiteur est classiquement utilisé pour la culture d'organoïdes  
 366 intestinaux pour empêcher la mort des cellules épithéliales isolées, l'inhibiteur ROCK, Y27632  
 367 (Li, Zhu, et al. 2019).

368 Pour améliorer la culture et plus précisément la différenciation des organoïdes intestinaux, il  
 369 est possible de moduler les concentrations des facteurs de niche tels que Wnt3a ou Noggin  
 370 comme cela a été décrit les organoïdes du caecum de lapin (Mussard et al. 2020) et les  
 371 entéroïdes bovins (Hamilton et al. 2018; Topfer et al. 2019).

372  
 373

### 374 c. Culture dans le temps des organoïdes intestinaux

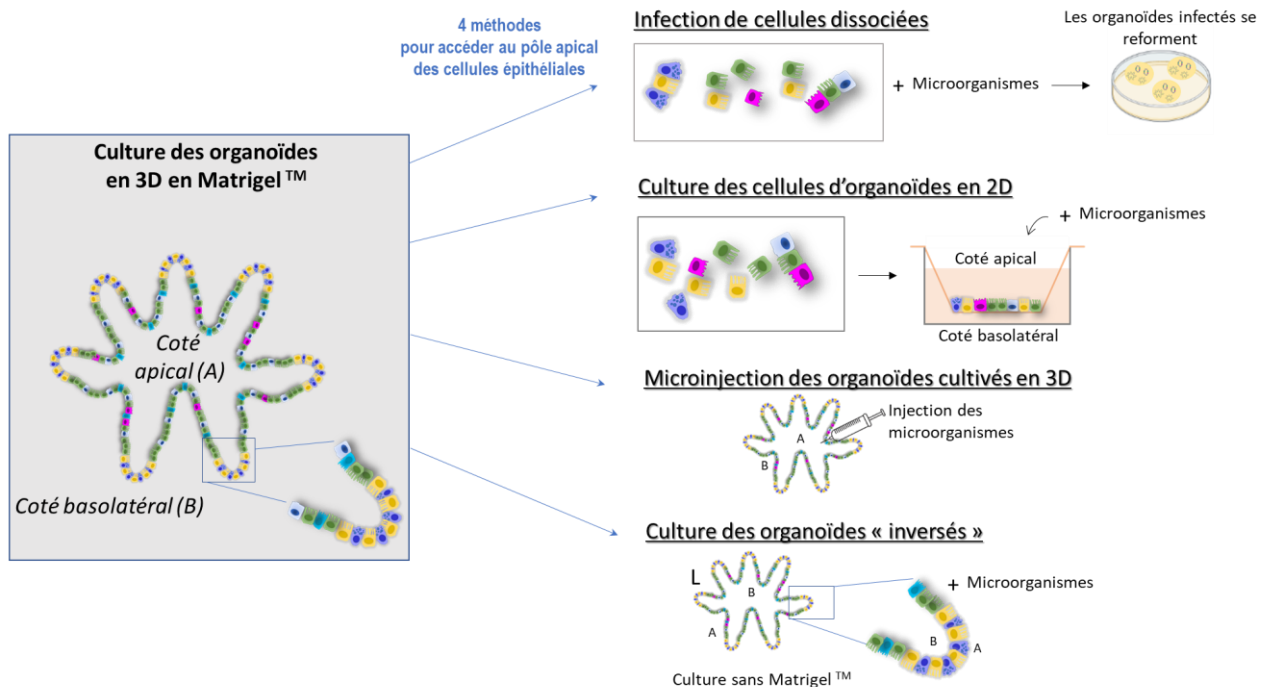
375

376 Dans tous les épithélia, la cellule épithéliale est dite « polarisée ». En effet, elle repose sur une  
 377 membrane basale ce qui permet de lui définir un pôle basal, en contact avec la membrane basale  
 378 et un pôle apical exposé au milieu « extérieur ». Cultivés en 3D dans une matrice, classiquement  
 379 dans du Matrigel<sup>TM</sup>, l'épithélium des organoïdes intestinaux acquiert cette caractéristique de  
 380 polarisation avec la partie apicale vers l'intérieur de l'organoïde. Cette orientation de  
 381 l'épithélium intestinal peut présenter des inconvénients à l'utilisation de ce modèle *in vitro*. Le  
 382 premier est directement relié aux caractéristiques intrinsèques de l'épithélium intestinal réputé  
 383 pour sa vitesse de renouvellement, qui est la plus élevée de l'organisme et qui entraîne une  
 384 quantité importante de cellules mortes s'accumulant dans la lumière des organoïdes classiques.  
 385 Cette accumulation excessive au cœur de l'organoïde de cellules mortes, par le phénomène  
 386 d'anoïkose, nécessite de les dissocier en moyenne chaque semaine pour les maintenir dans une  
 387 culture viable. L'autre inconvénient dépend de la question scientifique pour laquelle l'outil va  
 388 être utilisé. En effet, pour des études des interactions microbiote-épithélium, ou pathogènes-  
 389 épithélium ou encore pour étudier le devenir de nutriments, l'accès au pôle apical de  
 390 l'épithélium est indispensable. La technique de micro-injection est un moyen d'accéder à la  
 391 lumière de l'organoïde, cependant, elle nécessite un appareillage et une technicité complexe qui  
 392 ne sont pas adaptées à tous les questionnements scientifiques et notamment aux applications à  
 393 haut débit (Puschhof et al. 2021).

394

395 Pour pallier cet inconvénient majeur, d'autres façons de cultiver les organoïdes intestinaux ont  
 396 été décrits à partir de ce qui a été réalisé chez l'homme et la souris. Les organoïdes peuvent être  
 397 dissociés en plus petits fragments ou cellules isolées mécaniquement ou par digestion  
 398 enzymatique. Les fragments peuvent ainsi être exposés aux pathogènes ou à des nutriments puis  
 399 re-ensemencés en Matrigel™ pour se réorganiser et se transformer de nouveau en organoïdes.  
 400 L'inconvénient de cette méthode est la perte probable de polarité de l'épithélium une fois  
 401 dissocié, ce qui signifie que son exposition aux pathogènes ou à des nutriments n'est pas très  
 402 représentatif de la situation *in vivo*. Une autre approche consiste à ensemercer les cellules  
 403 isolées dans une configuration monocouche 2D sur une membrane de type Transwell. Elle a été  
 404 décrite pour les organoïdes intestinaux de poulet (Orr et al. 2021), de cheval (Hellman, 2021),  
 405 de lapin (Kardia E et al., 2021, Mussard E et al., 2020) et de porc (Hoffmann et al. 2021). Les  
 406 cellules sont alors capables de former une barrière avec un épithélium polarisé donnant un accès  
 407 facilité au pôle apical. Enfin, plus récemment, il a été décrit que les organoïdes intestinaux  
 408 peuvent être maintenus en culture en suspension induisant une inversion de la polarité des  
 409 cellules épithéliales de sorte que la membrane apicale soit tournée vers l'extérieur (Co et al.  
 410 2019; Co et al. 2021). Cette culture en suspension a été décrite avec des cryptes isolées du côlon  
 411 et du jéjunum porcins et de caeca de poulet (Li et al. 2020; Nash et al. 2021). La figure 5 illustre  
 412 une gamme de différentes méthodes utilisées pour avoir accès au pôle apical des cellules  
 413 épithéliales de l'organoïde intestinal.

414



415

416 Figure 5. Méthodes de culture pour accéder au pôle apical des cellules épithéliales.

417 *Les cellules épithéliales sont dites « orientées » avec un pôle apical (A), exposé à l'environnement*  
 418 *extérieur, et un pôle basal (B). La majorité des agents pathogènes à porte d'entrée intestinale envahit*  
 419 *l'hôte par le pôle apical des cellules. L'inconvénient majeur de la culture des organoïdes en 3D est la*  
 420 *difficulté d'accéder au pôle apical des cellules qui se trouve à l'intérieur de l'organoïde. Pour cela, 4*  
 421 *méthodes ont été décrites afin d'étudier par exemple les interactions hôtes-micro-organismes*  
 422 *(pathogènes ou commensaux).*

423  
424

## 425 4. Les applications des modèles d'organoïdes intestinaux chez les 426 animaux de rente

### 427 4.1. Etude de la barrière intestinale

428

429 Une fonction cruciale de l'épithélium intestinal est de former une barrière physique et  
 430 immunologique pour empêcher l'entrée dans l'organisme de composants lumineux nocifs.

431 Parmi les mécanismes de « barrière » de l'épithélium, le renouvellement constant tous  
 432 les 3 à 5 jours des cellules épithéliales intestinales est un mécanisme permettant de maintenir  
 433 l'intégrité épithéliale. Il génère la mort des cellules épithéliales intestinales par un mécanisme  
 434 de mort cellulaire appelé « Anoïkose » qui est reproduit *in vitro* dans la culture d'organoïdes et  
 435 est visualisé microscopiquement par l'apparition d'un « cœur » noir au centre de l'organoïde  
 436 après plusieurs jours de culture. L'expression des marqueurs de prolifération tels que LGR5,  
 437 SOX9, KI67 et PCNA dans les organoïdes atteste également de ce renouvellement continu des  
 438 cellules épithéliales intestinales. Ils sont exprimés dans des organoïdes de porc, de lapin, de  
 439 cheval, de poulet et de bovin, ce qui indique que la prolifération épithéliale est maintenue *in*  
 440 *vitro* (In et al. 2016; Panek, Grabacka, and Pierzchalska 2018; Mussard et al. 2020; Li, Zhu, et  
 441 al. 2019; van der Hee et al. 2018; Li, Fu, et al. 2019; Hamilton et al. 2018; Alfajaro et al. 2019;  
 442 Zhou et al. 2020; Engevik et al. 2020; Luo et al. 2020; Gonzalez et al. 2013).

443 Le maintien de la perméabilité épithéliale constitue un autre mécanisme de « barrière »  
 444 de l'épithélium.

445 Il est contrôlé par les protéines des jonctions serrées comme les claudines (CLAU),  
 446 l'occludine (OCLN), les JAM, les protéines de la *Zonula Occludens 1 à 3* (ZO1 à 3) (...), et  
 447 celles des jonctions adhérentes impliquant les Cadherines (CDH)...). Tous les gènes de ces  
 448 protéines sont exprimés dans les organoïdes intestinaux de porc, de lapin, de poulet et de bovin  
 449 (van der Hee et al. 2020; Mussard et al. 2020; Li, Fu, et al. 2019; Hamilton et al. 2018; Li et al.  
 450 2018). Plusieurs méthodes permettent d'évaluer la perméabilité de l'épithélium. L'incubation  
 451 des organoïdes intestinaux avec des sondes fluorescentes (FITC (isothiocyanate de  
 452 fluorescéine)-Dextran 4kDa ou LY (*Lucifer Yellow*)) et la non pénétration de ces produits à  
 453 l'intérieur de l'organoïde cultivé en 3D attestent de la perméabilité intacte de l'épithélium  
 454 (Bardenbacher et al. 2020). La mesure de résistance transépithéliale (TEER) et l'analyse du  
 455 transport apical-basal des sondes fluorescentes sont également un moyen d'étudier la  
 456 perméabilité épithéliale para et trans-cellulaire d'une monocouche 2D de cellules d'organoïdes  
 457 comme cela a été décrit pour le porc, le lapin, le bovin et plus récemment le poulet (Mussard et  
 458 al. 2020; van der Hee et al. 2018; Hamilton et al. 2018; Orr et al. 2021).

459 Enfin, la production de molécules à activité antimicrobienne ou ayant la particularité de  
 460 piéger ou bloquer l'accès à la cellule d'un microorganisme par les cellules épithéliales  
 461 intestinales est un mécanisme de protection de l'hôte. Par exemple, la production de mucine 2  
 462 (MUC-2), principale mucine gélifiante sécrétée par les cellules caliciformes, est exprimée par  
 463 les organoïdes intestinaux du porc, du lapin, du cheval et du bovin (Mussard et al. 2020; Li,  
 464 Zhu, et al. 2019; van der Hee et al. 2018; Derricott et al. 2019; Li, Fu, et al. 2019; Hamilton et  
 465 al. 2018; Alfajaro et al. 2019; Zhou et al. 2020; Pierzchalska et al. 2012). De plus, l'expression  
 466 de peptides antimicrobiens (REG3G, le lysozyme) a également été détectée dans des organoïdes  
 467 de porc, de cheval, de bovin et de lapin (Mussard et al. 2020; van der Hee et al. 2018; Li, Fu, et  
 468 al. 2019; Alfajaro et al. 2019; Engevik et al. 2020).

469

## 470 4.2. Etude de la fonction d'absorption des nutriments de l'épithélium

471

472 L'étude à l'échelle cellulaire des fonctions de digestion de l'épithélium des animaux de  
 473 rente, sans accès au tissu intestinal, est à présent rendue possible avec les organoïdes  
 474 intestinaux. En effet, outre son rôle de barrière, l'épithélium intestinal contribue également à la  
 475 digestion des aliments, à l'absorption des nutriments et à la régulation hormonale. Les  
 476 entérocytes sont les cellules absorbantes et expriment des marqueurs spécifiques tels que la  
 477 villine-1 (VIL1), la phosphatase alcaline (ALPI), et la kératine 20 (KRT20). Elles produisent  
 478 également des enzymes digestives (sucrase-isomaltase) et des transporteurs d'ions/nutriments  
 479 (exemples : transporteur de monocarboxylate (MCT1), co-transporteur de sodium-glucose-1  
 480 (SGLT1), échangeur sodium-hydrogène-3 (NHE3)), comme cela a été décrit dans les  
 481 organoïdes de porc, de lapin, de poulet et de bovin (In et al. 2016; Mussard et al. 2020; Li, Zhu,  
 482 et al. 2019; van der Hee et al. 2018; Derricott et al. 2019; d'Aldebert et al. 2020; Engevik et al.  
 483 2020; Gonzalez et al. 2013). Les cellules entéro-endocrines sont impliquées dans la sécrétion  
 484 d'hormones digestives telles que le peptide YY (PYY) et la chromogranine A (CHGA), leur  
 485 présence a été décrite dans les organoïdes de porc, de lapin, de poulet et de bovin (Nash et al.  
 486 2021; Mussard et al. 2020; Li, Zhu, et al. 2019; van der Hee et al. 2018; Derricott et al. 2019;  
 487 Hamilton et al. 2018; Zhou et al. 2020; Engevik et al. 2020).

488 Ainsi, les organoïdes intestinaux des animaux de rente possèdent les types cellulaires et  
 489 potentiellement toutes les caractéristiques physiologiques et fonctionnelles pour étudier le  
 490 transport des nutriments et la production d'hormones intestinales, comme cela a déjà été réalisé  
 491 chez la souris ou les entéroïdes humains (Pierzchalska et al. 2017; Ferrandis Vila et al. 2018).  
 492 Des études fonctionnelles réalisées chez le porc ont démontré que les cellules épithéliales  
 493 d'organoïdes intestinaux étaient capables de transporter des nutriments tels que des acides  
 494 aminés et des vitamines du côté apical au côté basolatéral comme l'épithélium *in vivo* (van der  
 495 Hee et al. 2020).

496 D'autres questionnements scientifiques visant à étudier l'impact de nutriments sur  
 497 l'homéostasie épithéliale peuvent également être abordés à l'aide de ces outils. Par exemple, il  
 498 a été montré que le traitement des organoïdes de porcelets avec de la vitamine A alimentaire  
 499 freine la différenciation des cellules épithéliales et favorise la prolifération, alors que le  
 500 traitement d'organoïdes de porc avec du glutamate augmente la prolifération épithéliale (Zietek  
 501 et al. 2015; Wang et al. 2020). De même une supplémentation dans l'alimentation en cuivre



502 favorise la croissance de l'épithélium intestinal des jeunes porcelets au sevrage et le modèle  
 503 organoïde a permis de démontrer le mode d'action du Cuivre qui favorise la prolifération des  
 504 cellules souches et la maturation de l'épithélium intestinal (Yin et al. 2021). Une étude récente  
 505 a démontré qu'un déficit en méthionine impacte négativement le développement de l'organoïde  
 506 intestinal du poulet suggérant qu'une déficience dans son alimentation pourrait empêcher toute  
 507 régénération de l'épithélium intestinal en cas de lésions (Wang et al. 2022). Ces études illustrent  
 508 bien l'intérêt de tels outils pour mieux comprendre l'importance de la nutrition animale dans le  
 509 maintien de la santé digestive.

510

### 511 **4.3. Etude des Interactions hôtes – micro-organismes**

512

513 Les modèles organoïdes intestinaux peuvent être utilisés pour modéliser les infections  
 514 entériques et ainsi mieux élucider les mécanismes d'entrée dans les cellules des agents  
 515 pathogènes, les mécanismes de réplication et de propagation intracellulaire mais aussi de sortie  
 516 des agents pathogènes. Par ailleurs, ils représentent le seul modèle permettant d'étudier *in vitro*  
 517 le rôle respectif des types cellulaires spécifiques dans ces processus infectieux et dans  
 518 l'induction des réponses immunitaires.

519 A l'heure actuelle, de nombreuses études d'infections d'organoïdes intestinaux dérivés  
 520 d'animaux de rente par des agents pathogènes à tropisme intestinal d'importance économique  
 521 majeure dans les élevages, ont permis de valider l'utilisation de cet outil pour modéliser les  
 522 infections.

#### 523 **a. Les agents infectieux étudiés**

524

525 Ainsi, des organoïdes intestinaux bovin ont été infectés avec succès par une variété  
 526 d'agents pathogènes entériques, tels que *Salmonella* Typhimurium, *Toxoplasma gondii* et des  
 527 rotavirus du groupe A (Derricott et al. 2019; Topfer et al. 2019). De même, les organoïdes  
 528 intestinaux de porc ont été infectés par plusieurs coronavirus porcins (virus de la diarrhée  
 529 épidémique porcine (PEDV), virus de la gastro-entérite transmissible (TGEV) et  
 530 deltacoronavirus porcine (PDCoV)) (Li, Zhu, et al. 2019; Tsai et al. 2018; Co et al. 2019;  
 531 Resende et al. 2020), également par les bactéries *Salmonella* Typhimurium (Derricott et al.  
 532 2019) et *Lawsonia intracellularis* (Li et al. 2020) et par le parasite protozoaire *Toxoplasma*  
 533 *gondii* (Derricott et al. 2019). Enfin, les organoïdes intestinaux aviaires ont également été  
 534 utilisés pour modéliser les infections à *Salmonella*, au parasite *Eimeria* et au virus Influenza A  
 535 (Nash et al. 2021). Voir Tableau 1.

536

#### 537 **b. Les modèles d'infection**

538

539 Pour ces différents modèles infectieux, les différentes approches décrites dans la figure  
 540 5 ont été utilisées afin de reproduire au mieux la voie physiologique d'entrée du pathogène  
 541 entérique. Le modèle d'infection d'organoïdes dissociés mécaniquement lors du passage a été  
 542 utilisé pour modéliser les infections des cellules épithéliales intestinales de porc et de bovin par  
 543 *Toxoplasma gondii* ou par *Salmonella* Typhimurium (Derricott et al. 2019). Les cellules  
 544 d'organoïdes cultivées en 2D sur une membrane ont permis les infections des cellules de porc

545 strictement par le pôle apical par des coronavirus porcins ou *Lawsonia intracellularis* (Li, Zhu,  
 546 et al. 2019; Tsai et al. 2018; Co et al. 2019; Li et al. 2020; Resende et al. 2020) ou ont permis  
 547 d'étudier l'impact d'endotoxines de *Salmonella* Typhimurium ou de *Bacillus subtilis* sur les  
 548 cellules épithéliales intestinales de poulet (Orr et al. 2021). La microinjection des organoïdes  
 549 par des agents pathogènes a été décrite pour modéliser l'infection par le parasite  
 550 *Cryptosporidium parvum* mais avec des organoïdes de souris (Dutta, Heo, and O'Connor 2019;  
 551 Heo et al. 2018). A l'heure actuelle, cette technologie nécessitant une expertise en  
 552 microinjection n'a pas été utilisée pour modéliser des infections d'animaux de ferme. Enfin, la  
 553 mise au point récente de la culture d'organoïde sans matrice permettant une exposition externe  
 554 du pôle apical des cellules de l'organoïde a permis de réaliser des infections par *Salmonella*, le  
 555 virus *Influenza* et le parasite *Eimeria tenella* du côté apical des cellules épithéliales intestinales  
 556 de poulet (Nash et al. 2021).

557

#### 558 **c. Etude des cellules cibles des infections**

559

560 L'avantage de la composition multicellulaire des organoïdes intestinaux est l'identification des  
 561 types de cellules épithéliales ciblées par les pathogènes entériques. Ainsi, des expériences de  
 562 double immunomarquage en fluorescence sur des entéroïdes de porc ont démontré que les virus  
 563 PEDV et le PDCoV infectaient principalement les entérocytes, les cellules souches et les  
 564 cellules caliciformes (Li, Zhu, et al. 2019; Tsai et al. 2018; Resende et al. 2020). Ces études  
 565 permettent donc de reproduire *in vitro* l'infection de l'épithélium intestinal dans un  
 566 environnement plus physiologique.

567 Les organoïdes intestinaux peuvent également être utilisés pour mieux comprendre le tropisme  
 568 du segment digestif des agents pathogènes entériques. En effet, les organoïdes intestinaux  
 569 conservent *in vitro* le phénotype de leur segment digestif d'origine, comme discuté ci-dessus.  
 570 La susceptibilité à l'infection par PEDV et PDCoV était plus élevée chez les organoïdes de porc  
 571 de l'intestin grêle que chez les organoïdes du côlon, reflétant les observations *in vivo* (Li, Zhu,  
 572 et al. 2019; Tsai et al. 2018). Des études plus approfondies ont démontré que le tropisme  
 573 préférentiel du jéjunum du PDCoV était associé à une expression plus élevée du récepteur  
 574 d'entrée aminopeptidase N dans les entéroïdes du jéjunum par rapport aux organoïdes dérivés  
 575 d'autres segments digestifs (Tsai et al. 2018).

576

#### 577 **d. Etude des réponses aux infections**

578

579 Après contact avec les agents pathogènes, les organoïdes intestinaux sont également capables  
 580 d'initier des réponses immunitaires innées. Les organoïdes de porc infectés par des coronavirus  
 581 porcins (PEDV, PDCoV et TGEV) augmentent l'expression des gènes des interférons de type  
 582 I et des cytokines inflammatoires (Li, Zhu, et al. 2019; Tsai et al. 2018; Resende et al. 2020).  
 583 Les cellules épithéliales intestinales d'organoïdes peuvent également répondre à des  
 584 stimulations par des endotoxines bactériennes de *Salmonella* Typhimurium et de *Bacillus*  
 585 *subtilis* en produisant de l'IL6 et de l'IL8 comme cela a été décrit dans le modèle aviaire (Orr  
 586 et al. 2021). C'est également le cas lors d'interactions de ligands bactériens et viraux avec des  
 587 entéroïdes de chevaux, qui répondent en produisant des cytokines inflammatoires telles que du

588 TNF- $\alpha$  (*Tumor necrosis factor*- $\alpha$ ), du TGF $\beta$ , de l'IL33 et de l'IFN $\beta$  (*Interferon*- $\beta$ ) (Hellman  
 589 2021).

590

#### 591 e. Etude des interactions des cellules épithéliales avec des bactéries commensales

592

593 Si les connaissances scientifiques du dialogue entre les pathogènes et l'intestin vont continuer  
 594 de s'accroître grâce à l'utilisation des modèles des organoïdes intestinaux des animaux de rente,  
 595 ces derniers sont également d'une grande utilité pour aider à évaluer l'impact des bactéries  
 596 commensales dans le maintien de l'épithélium intestinal, dans sa maturation ou régénération  
 597 lors de processus de cicatrisation (Rubert et al. 2020; Min, Kim, and Cho 2020) et dans ses  
 598 fonctions digestives. En effet, *in vivo*, l'épithélium intestinal est en contact permanent avec des  
 599 microorganismes commensaux constituant le microbiote intestinal. Actuellement, la plupart des  
 600 études co-cultivant les organoïdes intestinaux avec des bactéries commensales ont été réalisées  
 601 avec des organoïdes murins ou humains. Par exemple, des études utilisant des organoïdes  
 602 intestinaux murins ont révélé un lien entre le microbiote intestinal et la régénération épithéliale.  
 603 En effet, les cellules souches répondent fortement au peptidoglycane des bactéries du  
 604 microbiote qui stimule la survie des cellule souches (Nigro et al. 2014). Dans une autre étude,  
 605 la coculture des organoïdes iléaux de souris avec une bactérie intestinale commensale  
 606 *Akkermansia muciniphila* a permis de démontrer le rôle de bactéries du microbiote et de leur  
 607 production en métabolites dans le renouvellement de l'épithélium intestinal (Lukovac et al.  
 608 2014). Un effet réparateur a également pu être illustré après stimulation des organoïdes de  
 609 l'intestin grêle de souris préalablement traité au TNF $\alpha$  par le probiotique *Lactobacillus reuteri*  
 610 (Hou et al. 2018). Le microbiote intestinal joue donc un rôle essentiel dans l'homéostasie et la  
 611 réparation de l'épithélium, toutefois il représente un immensément complexe écosystème. En  
 612 effet, les microbes intestinaux interagissent les uns avec les autres en partageant les ressources  
 613 et les réseaux métaboliques, conduisant ainsi à des comportements compétitifs, mutualistes ou  
 614 symbiotiques (Stubbenieck, Vargas-Bautista, and Straight 2016). Les modèles d'étude  
 615 évaluant les effets d'un seul microbe peuvent facilement exagérer l'impact du microbiote  
 616 intestinal individuel, soulignant l'avantage de complexifier les modèles de culture organoïdes  
 617 intestinaux *in vitro* par de nouvelles approches introduisant de la fluidique et des échanges  
 618 gazeux contrôlés (voir paragraphe suivant).

619

### 620 5. Complexification des modèles d'organoïdes intestinaux des animaux 621 de rente dans le futur...

622

623 Des avancées récentes ont montré qu'il était possible de complexifier encore plus les modèles  
 624 de culture d'organoïdes intestinaux, essentiellement humains et murins, pour obtenir un modèle  
 625 *in vitro* le plus physiologique possible. Pour cela, des composantes du système nerveux  
 626 entérique, des cellules immunitaires, des contraintes mécaniques reproduisant le péristaltisme,  
 627 ou encore une exposition à du microbiote peuvent être ajoutés à la culture *in vitro* pour  
 628 reproduire au mieux la complexité de l'environnement intestinal.

629

630 **a. Co-culture avec des cellules immunitaires**

631

632 Les organoïdes intestinaux ne comportent pas de cellules immunitaires dont l'origine cellulaire  
 633 est différente. Environ 60-70 % des cellules immunitaires (macrophages, cellules dendritiques,  
 634 cellules lymphoïdes, lymphocytes T et B) sont retrouvées au niveau de l'intestin. Il existe une  
 635 coopération entre l'épithélium intestinal et le système immunitaire afin de renforcer la barrière  
 636 intestinale, protéger l'organisme contre les agressions extérieures et permettre la tolérance des  
 637 aliments. Pour récapituler cet environnement cellulaire, différentes cellules du système  
 638 immunitaire telles que des lymphocytes T et des macrophages ont été co-cultivés avec des  
 639 organoïdes intestinaux humains (Staab et al. 2020; Schreurs et al. 2021). Le modèle  
 640 d'organoïdes intestinaux humains en 2D cultivés avec des macrophages du côté basolatéral a  
 641 permis de reproduire le phénomène d'extension de dendrites à travers la monocouche de  
 642 cellules épithéliales servant à capter des particules étrangères comme des bactéries pathogènes  
 643 du côté apical (Noel et al. 2017). La co-culture avec des lymphocytes a permis de décrire l'effet  
 644 positif de l'IL-2, une cytokine produite par les cellules lymphoïdes en prolifération sur la  
 645 maturation des organoïdes humain dérivés d'iPSC, visualisée microscopiquement par  
 646 l'augmentation du nombre de bourgeons (cryptes) par organoïde. Dans ce système, les cellules  
 647 épithéliales de l'organoïde augmentent leur expression de facteurs de transcription de  
 648 l'épithélium digestif tels que CDX2, SOX9 et ISX et des marqueurs spécifiques des types  
 649 cellulaires (entérocytes, cellules entéroendocrines, cellules de Paneth et caliciformes) attestant  
 650 l'effet de cette cytokine sur l'épithélium intestinal (Jung et al. 2018).

651 Dans l'intestin et plus particulièrement dans les plaques de Peyer, une cellule épithéliale  
 652 particulière est présente, il s'agit des cellules M (M pour Microvillosité ou *Microfold*). Les  
 653 cellules M sont dépourvues de microvillosités mais, comme d'autres cellules épithéliales, elles  
 654 se caractérisent par des jonctions intercellulaires puissantes. Ces cellules sont connues pour  
 655 initier des réponses du système immunitaire au niveau des muqueuses et permettre le transport  
 656 de microbes et de particules à travers la paroi intestinale, les captant dans la lumière intestinale  
 657 pour les mener jusqu'à la lamina propria où des interactions avec les cellules immunitaires  
 658 peuvent avoir lieu. La proximité des cellules épithéliales avec les nombreuses cellules  
 659 immunitaires des Plaques de Peyer est à l'origine de la différenciation des cellules épithéliales  
 660 en cellules M via la production de RANKL. Ainsi, en ajoutant la protéine recombinante  
 661 RANKL dans une culture d'organoïde intestinal humain, des cellules M ont été obtenues *in*  
 662 *vitro* permettant d'étudier la capture de microparticules et le tropisme préférentiel de  
 663 *Salmonella* pour ces cellules (Rouch et al. 2016).

664 Une étude récente a décrit la présence de cellules immunitaires de type macrophage, cellules  
 665 dendritiques et dans une moindre mesure de cellules NK et de lymphocytes B, dans une culture  
 666 d'entéroïdes de poulets dérivés de cryptes isolées d'embryon de poulet pendant 7 jours. Les  
 667 cellules immunitaires présentes dans la culture sont fonctionnelles et capables de phagocytose,  
 668 toutefois, l'étude ne révèle pas si la présence de ces cellules persiste au fur et à mesure des  
 669 passages des organoïdes (Nash et al. 2021).

670 Toutes ces études ouvrent des perspectives pour étudier *in vitro* par exemple les interactions  
 671 hôtes pathogènes et plus particulièrement la coopération cellules épithéliales et cellules  
 672 immunitaires dans cette réponse, chez les animaux de rente.

673

 674 **b. Complexification par ajout de terminaisons nerveuses**

675

676 Un autre des composants majeurs du tube digestif est le SNE. Le système nerveux  
 677 entérique joue un rôle essentiel dans l'absorption des nutriments, la perméabilité de la barrière  
 678 intestinale et la motilité. Des avancées récentes ont permis de mettre au point des co-cultures  
 679 d'organoïdes intestinaux humains avec des cellules de crête neurales obtenues *in vitro* à partir  
 680 de PSC. Co-cultivées avec les cellules épithéliales intestinales de l'organoïdes, elles migrent  
 681 dans le mésenchyme où elles se différencient en neurones et cellules gliales et permettent  
 682 l'obtention d'un système nerveux fonctionnel, mimant ainsi les fonctions physiologiques du  
 683 tissu chez l'homme (Workman et al. 2017; Schlieve et al. 2017). Ce modèle n'a pas encore été  
 684 développé chez l'animal de rente, mais il est aujourd'hui d'un grand intérêt pour les études en  
 685 neurogastro-entérologie chez l'Homme.

686

 687 **c. Intestin sur puce : de la fluidique pour permettre la co-culture d'un épithélium avec**  
 688 **un microbiote intestinal complexe**

689

690 Les nouveaux dispositifs dit « d'intestin sur puce » représentent une technologie  
 691 révolutionnaire pour reproduire au mieux le compartiment intestinal en complexifiant la culture  
 692 « statiques » des cellules épithéliales intestinales. Il comporte un dispositif microfluidique qui  
 693 reproduit la structure physique, le microenvironnement, les mouvements et la circulation des  
 694 fluides dans l'intestin (Figure 6). Le développement de ces modèles offre des perspectives  
 695 inespérées pour accélérer la recherche sur le microbiote intestinal et leur utilisation en santé  
 696 humaine et animal.

697

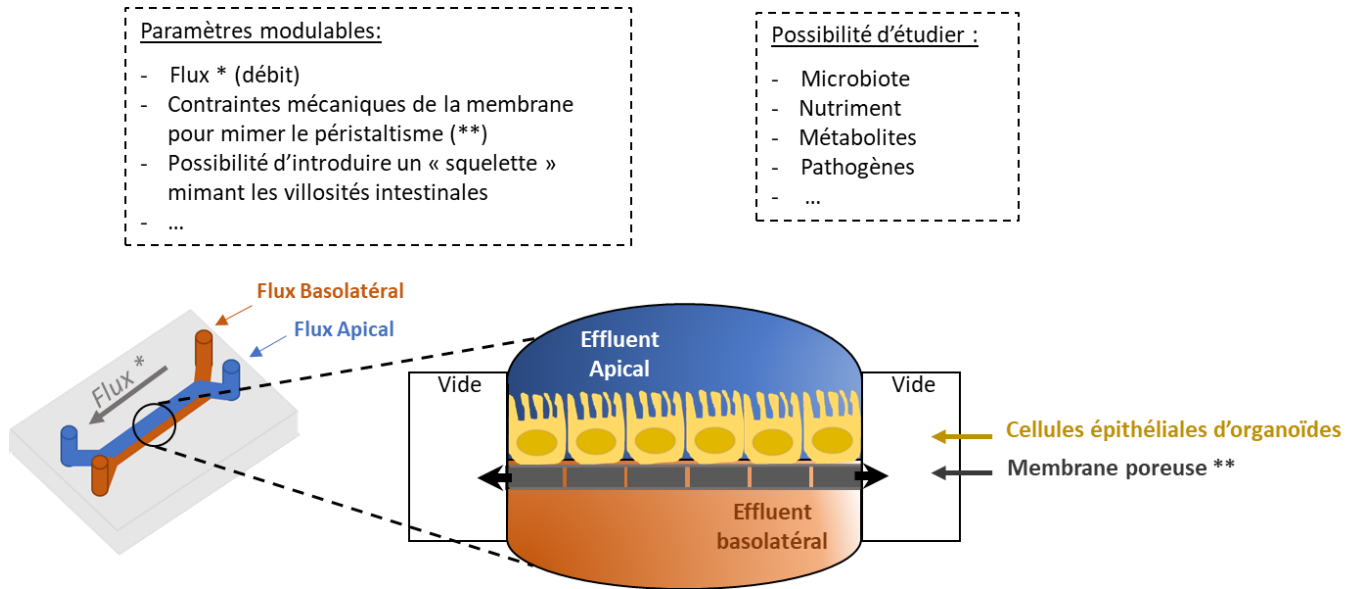
698

699

700

701

702



703  
704

705 Figure 6. Dispositif d'un intestin sur puce.

706  
707

708 En effet, le rôle du microbiote intestinal vis-à-vis de la santé est un domaine de recherche en  
709 pleine expansion et une thématique porteuse d'innovation en santé humaine et animale. Les  
710 connaissances autour du microbiote intestinal sont source de nouvelles solutions préventives ou  
711 thérapeutiques qui intéressent de nombreux secteurs industriels (agroalimentaire,  
712 pharmaceutique, diagnostic, ou nutrition-santé, humaine ou animale).

713 La croissance de communautés bactériennes intestinales complexes est faisable *in vitro* mais  
714 nécessite des conditions de milieu et d'oxygénation particulières. Le dispositif dit « intestin sur  
715 puce » permet d'introduire une culture stable de communautés microbiennes complexes au  
716 contact des cellules épithéliales d'organoïdes. Le cœur du dispositif est une puce miniaturisée  
717 qui comprend une membrane poreuse sur laquelle sont ensemencées les cellules intestinales  
718 entourée de deux micro-canaux pour alimenter respectivement les pôles apical et basal des  
719 cellules épithéliales. Cette disposition permet de simuler la barrière entre la lumière intestinale  
720 et le système vasculaire drainant. L'apport continu de nutriments est assuré par les canaux de  
721 microfluidique reliés à des pompes. Parce que ce dispositif permet d'appliquer des conditions  
722 de culture distinctes entre deux compartiments, c'est aujourd'hui l'outil le plus performant et  
723 le plus pertinent pour modéliser *in vitro* les interactions entre cellules digestives et les micro-  
724 organismes (Siwczak et al. 2021). Aujourd'hui, ce dispositif n'a pas encore été utilisé avec les  
725 organoïdes des animaux de rente mais seulement à partir d'organoïdes humain (Kasendra et al.  
726 2018; Beurivage et al. 2020). Il a notamment permis de montrer qu'il était possible de  
727 maintenir des communautés bactériennes avec plusieurs espèces sur une période de quelques  
728 jours à quelques semaines (Kim et al. 2016; Marzorati et al. 2014). Des études plus récentes sur  
729 ce nouveau modèle de puces démontrent la possibilité de cultiver des bactéries aérobies et  
730 anaérobies sur plusieurs jours en soumettant au dispositif un gradient d'oxygène du côté basal  
731 au côté luminal (Jalili-Firoozinezhad et al. 2019). La complexité de ce nouveau dispositif avec  
732 une architecture physique « Crypte -villosités » et des paramètres physiologiques de flux

733 continu et de péristaltisme semble également reproduire des conditions favorables pour une  
 734 infection par des agents pathogènes entériques. Lors d'une infection *in vitro* par la bactérie  
 735 pathogène humaine *Shigella*, l'expression des facteurs d'invasion est activée favorisant ainsi  
 736 son entrée dans les cellules épithéliales (Grassart et al. 2019).

737

## 738 Conclusion

739

740 De plus en plus et dans de nombreux domaines, les organoïdes remplacent les modèles de  
 741 culture *in vitro* traditionnels. En élevage, le développement de cet outil biologique est d'autant  
 742 plus important qu'il représente le seul modèle cellulaire disponible pour certaines espèces et  
 743 permet de réduire le nombre d'animaux en expérimentation répondant ainsi au principe des 3R  
 744 et à la demande sociétale. La création de biobanques d'organoïdes intestinaux d'animaux  
 745 d'élevage disponibles en tant que ressources ouvertes pour la communauté des chercheurs  
 746 contribuerait également à la réduction des expérimentations sur des animaux vivants. Comme  
 747 condition préalable à la création de biobanques partagées, l'harmonisation des protocoles  
 748 utilisés pour la culture d'organoïdes intestinaux d'animaux de rente (par exemple la composition  
 749 des milieux de culture) et la proposition de lignes directrices pour assurer la reproductibilité des  
 750 modèles entre les laboratoires sont absolument nécessaires.

751

752 Les domaines d'application des organoïdes intestinaux des animaux de rente sont très nombreux  
 753 pour les études à la fois en recherche fondamentale et en recherche appliquée. Mieux  
 754 comprendre les infections (sensibilité ou résistance de l'hôte à une infection, ou expression de  
 755 facteurs de virulence des pathogènes dans un environnement particulier...), l'efficacité  
 756 alimentaire ou encore analyser le génome sont autant de questionnements qui seront plus faciles  
 757 à appréhender avec ces nouveaux outils. Ils seront également très utiles pour la recherche  
 758 appliquée avec principalement des criblages de molécules/microbes pour améliorer la santé  
 759 intestinale des animaux. Ils ne remplaceront pas les essais sur les animaux, mais permettront  
 760 de sélectionner les molécules/microbes intéressants à tester *in vivo* et ainsi réduire le nombre  
 761 d'animaux utilisés. Ces modèles ayant démontré leur intérêt en recherche, ils ont plus  
 762 récemment été développés pour les chiens et permettent d'envisager en santé vétérinaire une  
 763 thérapeutique adaptée pour les animaux de compagnie à partir d'une biopsie intestinale (Kramer  
 764 et al. 2020; Ambrosini et al. 2020; Chandra et al. 2019).

765

766 L'utilisation de ces outils devient donc incontournable pour les recherches futures et en  
 767 association avec d'autres nouvelles technologies telles que l'édition des génomes, ces outils  
 768 représentent des accélérateurs technologiques pour accroître rapidement les connaissances en  
 769 recherche humaine et animale.

770

771

772 **Contribution des auteurs**

773 Sonia Lacroix-Lamande (sonia.lamande@inrae.fr) et Agnès Wiedemann (agnes.wiedemann@inrae.fr)  
 774 ont contribué de façon similaire à l'élaboration cet article.  
 775

776 **Remerciements**

777 Les illustrations présentées dans cet article sont issues de travaux financés par le projet  
 778 ANIMALT FEDER/Region Centre Val de Loire (FEDER convention EX007516, Region  
 779 Centre 2019-00134936, programme AE-2019-1850), le projet Européen Veterinary  
 780 Biocontained research facility Network (VETBIONET) et la Fédération de recherche en  
 781 Infectiologie de la Région Centre Val de Loire (FéRI).  
 782 Nous remercions Ophélie Bernardi et Anissa Gagneux pour leur aide technique et Julien  
 783 Burgault-Gaillard de la plateforme de microscopie de l'Université de Tours pour les images de  
 784 microscopie électronique à transmission.  
 785 Nous remercions le GT organoïdes INRAE et plus particulièrement Dr. Martin Beaumont, Dr.  
 786 Fany Blanc, Dr. Claire Cherbuy, Dr. Giorgia Egidy et Dr. Elisabetta Giuffra avec qui nous  
 787 avons rédigé une revue internationale sur les organoïdes intestinaux des animaux de rente  
 788 (Beaumont et al. 2021) et dont cette synthèse découle en partie. Enfin, nous tenons également  
 789 à remercier Dr. Sandrine Menard pour la relecture de cette synthèse.  
 790

791 **Références**

792  
 793 Acharya, M., K. Arsi, A. M. Donoghue, R. Liyanage, and N. C. Rath. 2020. 'Production and  
 794 characterization of avian crypt-villus enteroids and the effect of chemicals', *BMC Vet*  
 795 *Res*, 16: 179. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02397-1>  
 796 Alfajaro, M. M., J. Y. Kim, L. Barbe, E. H. Cho, J. G. Park, M. Soliman, Y. B. Baek, M. I.  
 797 Kang, S. H. Kim, G. J. Kim, S. I. Park, J. L. Pendu, and K. O. Cho. 2019. 'Dual  
 798 Recognition of Sialic Acid and alphaGal Epitopes by the VP8\* Domains of the Bovine  
 799 Rotavirus G6P[5] WC3 and of Its Mono-reassortant G4P[5] RotaTeq Vaccine Strains', *J*  
 800 *Virol*, 93. <https://doi.org/10.1128/JVI.00941-19>  
 801 Ambrosini, Y. M., Y. Park, A. E. Jergens, W. Shin, S. Min, T. Atherly, D. C. Borcharding, J.  
 802 Jang, K. Allenspach, J. P. Mochel, and H. J. Kim. 2020. 'Recapitulation of the accessible  
 803 interface of biopsy-derived canine intestinal organoids to study epithelial-luminal  
 804 interactions', *PLoS One*, 15: e0231423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231423>  
 805 Bardenbacher, M., B. Ruder, N. Britzen-Laurent, E. Naschberger, C. Becker, R. Palmisano, M.  
 806 Sturzl, and P. Tripal. 2020. 'Investigating Intestinal Barrier Breakdown in Living  
 807 Organoids', *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/60546>  
 808 Beaumont, M., F. Blanc, C. Cherbuy, G. Egidy, E. Giuffra, S. Lacroix-Lamande, and A.  
 809 Wiedemann. 2021. 'Intestinal organoids in farm animals', *Vet Res*, 52: 33.  
 810 <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00909-x>  
 811 Beurivage, C., A. Kanapeckaite, C. Loomans, K. S. Erdmann, J. Stallen, and R. A. J. Janssen.  
 812 2020. 'Development of a human primary gut-on-a-chip to model inflammatory processes',  
 813 *Sci Rep*, 10: 21475. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78359-2>  
 814 Bogliotti, Y. S., J. Wu, M. Vilarino, D. Okamura, D. A. Soto, C. Zhong, M. Sakurai, R. V.  
 815 Sampaio, K. Suzuki, J. C. Izipisua Belmonte, and P. J. Ross. 2018. 'Efficient derivation of



- 816 stable primed pluripotent embryonic stem cells from bovine blastocysts', *Proc Natl Acad*  
 817 *Sci U S A*, 115: 2090-95. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716161115>
- 818 Chandra, L., D. C. Borchering, D. Kingsbury, T. Atherly, Y. M. Ambrosini, A. Bourgois-  
 819 Mochel, W. Yuan, M. Kimber, Y. Qi, Q. Wang, M. Wannemuehler, N. M. Ellinwood, E.  
 820 Snella, M. Martin, M. Skala, D. Meyerholz, M. Estes, M. E. Fernandez-Zapico, A. E.  
 821 Jergens, J. P. Mochel, and K. Allenspach. 2019. 'Derivation of adult canine intestinal  
 822 organoids for translational research in gastroenterology', *BMC Biol*, 17: 33.  
 823 <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0652-6>
- 824 Co, J. Y., M. Margalef-Catala, X. Li, A. T. Mah, C. J. Kuo, D. M. Monack, and M. R. Amieva.  
 825 2019. 'Controlling Epithelial Polarity: A Human Enteroid Model for Host-Pathogen  
 826 Interactions', *Cell Rep*, 26: 2509-20 e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.108>
- 827 Co, J. Y., M. Margalef-Catala, D. M. Monack, and M. R. Amieva. 2021. 'Controlling the  
 828 polarity of human gastrointestinal organoids to investigate epithelial biology and  
 829 infectious diseases', *Nat Protoc*, 16: 5171-92. [https://doi.org/10.1038/s41596-021-00607-](https://doi.org/10.1038/s41596-021-00607-0)  
 830 0
- 831 d'Aldebert, E., M. Quaranta, M. Sebert, D. Bonnet, S. Kirzin, G. Portier, J. P. Duffas, S. Chabot,  
 832 P. Lluet, S. Allart, A. Ferrand, L. Alric, C. Racaud-Sultan, E. Mas, C. Deraison, and N.  
 833 Vergnolle. 2020. 'Characterization of Human Colon Organoids From Inflammatory  
 834 Bowel Disease Patients', *Front Cell Dev Biol*, 8: 363.  
 835 <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00363>
- 836 Derricott, H., L. Luu, W. Y. Fong, C. S. Hartley, L. J. Johnston, S. D. Armstrong, N. Randle,  
 837 C. A. Duckworth, B. J. Campbell, J. M. Wastling, and J. L. Coombes. 2019. 'Developing  
 838 a 3D intestinal epithelium model for livestock species', *Cell Tissue Res*, 375: 409-24.  
 839 <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2924-9>
- 840 Dutta, D., I. Heo, and R. O'Connor. 2019. 'Studying Cryptosporidium Infection in 3D Tissue-  
 841 derived Human Organoid Culture Systems by Microinjection', *Jove-Journal of Visualized*  
 842 *Experiments*. <https://doi.org/10.3791/59610>
- 843 Engevik, A. C., A. W. Coutts, I. Kaji, P. Rodriguez, F. Ongaratto, M. Saqui-Salces, R. L.  
 844 Medida, A. R. Meyer, E. Kolobova, M. A. Engevik, J. A. Williams, M. D. Shub, D. F.  
 845 Carlson, T. Melkamu, and J. R. Goldenring. 2020. 'Editing Myosin VB Gene to Create  
 846 Porcine Model of Microvillus Inclusion Disease, With Microvillus-Lined Inclusions and  
 847 Alterations in Sodium Transporters', *Gastroenterology*, 158: 2236-49 e9.  
 848 <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.034>
- 849 Ferrandis Vila, M., M. P. Trudeau, Y. T. Hung, Z. Zeng, P. E. Urriola, G. C. Shurson, and M.  
 850 Saqui-Salces. 2018. 'Dietary fiber sources and non-starch polysaccharide-degrading  
 851 enzymes modify mucin expression and the immune profile of the swine ileum', *PLoS*  
 852 *One*, 13: e0207196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207196>
- 853 Fitzgerald, S. F., A. E. Beckett, J. Palarea-Albaladejo, S. McAteer, S. Shaaban, J. Morgan, N.  
 854 I. Ahmad, R. Young, N. A. Mabbott, L. Morrison, J. L. Bono, D. L. Gally, and T. N.  
 855 McNeilly. 2019. 'Shiga toxin sub-type 2a increases the efficiency of Escherichia coli  
 856 O157 transmission between animals and restricts epithelial regeneration in bovine  
 857 enteroids', *PLoS Pathog*, 15: e1008003. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008003>
- 858 Gao, X., M. Nowak-Imialek, X. Chen, D. Chen, D. Herrmann, D. Ruan, A. C. H. Chen, M. A.  
 859 Eckersley-Maslin, S. Ahmad, Y. L. Lee, T. Kobayashi, D. Ryan, J. Zhong, J. Zhu, J. Wu,  
 860 G. Lan, S. Petkov, J. Yang, L. Antunes, L. S. Campos, B. Fu, S. Wang, Y. Yong, X.  
 861 Wang, S. G. Xue, L. Ge, Z. Liu, Y. Huang, T. Nie, P. Li, D. Wu, D. Pei, Y. Zhang, L. Lu,  
 862 F. Yang, S. J. Kimber, W. Reik, X. Zou, Z. Shang, L. Lai, A. Surani, P. P. L. Tam, A.  
 863 Ahmed, W. S. B. Yeung, S. A. Teichmann, H. Niemann, and P. Liu. 2019. 'Establishment  
 864 of porcine and human expanded potential stem cells', *Nat Cell Biol*, 21: 687-99.  
 865 <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0333-2>

- 866 Gehart, H., and H. Clevers. 2019. 'Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells',  
 867 Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 16: 19-34. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0081-y>
- 868 Gonzalez, L. M., I. Williamson, J. A. Piedrahita, A. T. Blikslager, and S. T. Magness. 2013.  
 869 'Cell lineage identification and stem cell culture in a porcine model for the study of  
 870 intestinal epithelial regeneration', PLoS One, 8: e66465.  
 871 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066465>
- 872 Grassart, A., V. Malarde, S. Gobaa, A. Sartori-Rupp, J. Kerns, K. Karalis, B. Marteyn, P.  
 873 Sansonetti, and N. Sauvonnet. 2019. 'Bioengineered Human Organ-on-Chip Reveals  
 874 Intestinal Microenvironment and Mechanical Forces Impacting Shigella Infection', Cell  
 875 Host Microbe, 26: 435-44 e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.08.007>
- 876 Gribble, F. M., and F. Reimann. 2019. 'Function and mechanisms of enteroendocrine cells and  
 877 gut hormones in metabolism', Nat Rev Endocrinol, 15: 226-37.  
 878 <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0168-8>
- 879 Hamilton, C. A., R. Young, S. Jayaraman, A. Sehgal, E. Paxton, S. Thomson, F. Katzer, J.  
 880 Hope, E. Innes, L. J. Morrison, and N. A. Mabbott. 2018. 'Development of in vitro  
 881 enteroids derived from bovine small intestinal crypts', Vet Res, 49: 54.  
 882 <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0547-5>
- 883 Hellman, S. 2021. 'Generation of equine enteroids and enteroid-derived 2D monolayers that are  
 884 responsive to microbial mimics', Vet Res, 52: 108. [https://doi.org/10.1186/s13567-021-](https://doi.org/10.1186/s13567-021-00976-0)  
 885 [00976-0](https://doi.org/10.1186/s13567-021-00976-0)
- 886 Heo, I., D. Dutta, D. A. Schaefer, N. Iakobachvili, B. Artegiani, N. Sachs, K. E. Boonekamp,  
 887 G. Bowden, A. P. A. Hendrickx, R. J. L. Willems, P. J. Peters, M. W. Riggs, R. O'Connor,  
 888 and H. Clevers. 2018. 'Modelling Cryptosporidium infection in human small intestinal  
 889 and lung organoids', Nature Microbiology, 3: 814-+. [https://doi.org/10.1038/s41564-018-](https://doi.org/10.1038/s41564-018-0177-8)  
 890 [0177-8](https://doi.org/10.1038/s41564-018-0177-8)
- 891 Hofer, M., and M. P. Lutolf. 2021. 'Engineering organoids', Nat Rev Mater, 6: 402-20.  
 892 <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00279-y>
- 893 Hoffmann, P., N. Schnepel, M. Langeheine, K. Kunnemann, G. A. Grassl, R. Brehm, B. Seeger,  
 894 G. Mazzuoli-Weber, and G. Breves. 2021. 'Intestinal organoid-based 2D monolayers  
 895 mimic physiological and pathophysiological properties of the pig intestine', PLoS One,  
 896 16: e0256143. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256143>
- 897 Holmberg, F. E., J. B. Seidelin, X. Yin, B. E. Mead, Z. Tong, Y. Li, J. M. Karp, and O. H.  
 898 Nielsen. 2017. 'Culturing human intestinal stem cells for regenerative applications in the  
 899 treatment of inflammatory bowel disease', EMBO Mol Med, 9: 558-70.  
 900 <https://doi.org/10.15252/emmm.201607260>
- 901 Holthaus, D., E. Delgado-Betancourt, T. Aebischer, F. Seeber, and C. Klotz. 2020.  
 902 'Harmonization of Protocols for Multi-Species Organoid Platforms to Study the Intestinal  
 903 Biology of Toxoplasma gondii and Other Protozoan Infections', Front Cell Infect  
 904 Microbiol, 10: 610368. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.610368>
- 905 Hou, Q., L. Ye, H. Liu, L. Huang, Q. Yang, J. R. Turner, and Q. Yu. 2018. 'Lactobacillus  
 906 accelerates ISCs regeneration to protect the integrity of intestinal mucosa through  
 907 activation of STAT3 signaling pathway induced by LPLs secretion of IL-22', Cell Death  
 908 Differ, 25: 1657-70. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0070-2>
- 909 In, J. G., J. Foulke-Abel, M. K. Estes, N. C. Zachos, O. Kovbasnjuk, and M. Donowitz. 2016.  
 910 'Human mini-guts: new insights into intestinal physiology and host-pathogen  
 911 interactions', Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 13: 633-42.  
 912 <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.142>
- 913 Jalili-Firoozinezhad, S., F. S. Gazzaniga, E. L. Calamari, D. M. Camacho, C. W. Fadel, A. Bein,  
 914 B. Swenor, B. Nestor, M. J. Cronce, A. Tovaglieri, O. Levy, K. E. Gregory, D. T. Breault,  
 915 J. M. S. Cabral, D. L. Kasper, R. Novak, and D. E. Ingber. 2019. 'A complex human gut

- 916 microbiome cultured in an anaerobic intestine-on-a-chip', *Nat Biomed Eng*, 3: 520-31.  
 917 <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0397-0>
- 918 Jung, K. B., H. Lee, Y. S. Son, M. O. Lee, Y. D. Kim, S. J. Oh, O. Kwon, S. Cho, H. S. Cho,  
 919 D. S. Kim, J. H. Oh, M. Zilbauer, J. K. Min, C. R. Jung, J. Kim, and M. Y. Son. 2018.  
 920 'Interleukin-2 induces the in vitro maturation of human pluripotent stem cell-derived  
 921 intestinal organoids', *Nat Commun*, 9: 3039. [https://doi.org/10.1038/s41467-018-05450-](https://doi.org/10.1038/s41467-018-05450-8)  
 922 [8](https://doi.org/10.1038/s41467-018-05450-8)
- 923 Kar, S. K., J. M. Wells, E. D. Ellen, M. F. W. Te Pas, O. Madsen, M. A. M. Groenen, and H.  
 924 Woelders. 2021. 'Organoids: a promising new in vitro platform in livestock and veterinary  
 925 research', *Vet Res*, 52: 43. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00904-2>
- 926 Kardia, E., M. Frese, E. Smertina, T. Strive, X. L. Zeng, M. Estes, and R. N. Hall. 2021. 'Culture  
 927 and differentiation of rabbit intestinal organoids and organoid-derived cell monolayers',  
 928 *Sci Rep*, 11: 5401. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84774-w>
- 929 Kasendra, M., A. Tovaglieri, A. Sontheimer-Phelps, S. Jalili-Firoozinezhad, A. Bein, A.  
 930 Chalkiadaki, W. Scholl, C. Zhang, H. Rickner, C. A. Richmond, H. Li, D. T. Breault, and  
 931 D. E. Ingber. 2018. 'Development of a primary human Small Intestine-on-a-Chip using  
 932 biopsy-derived organoids', *Sci Rep*, 8: 2871. [https://doi.org/10.1038/s41598-018-21201-](https://doi.org/10.1038/s41598-018-21201-7)  
 933 [7](https://doi.org/10.1038/s41598-018-21201-7)
- 934 Kim, H. J., H. Li, J. J. Collins, and D. E. Ingber. 2016. 'Contributions of microbiome and  
 935 mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human  
 936 gut-on-a-chip', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113: E7-15.  
 937 <https://doi.org/10.1073/pnas.1522193112>
- 938 Koltés, D. A., and N. K. Gabler. 2016. 'Characterization of porcine intestinal enteroid cultures  
 939 under a lipopolysaccharide challenge<sup>1</sup>', *Journal of Animal Science*, 94: 335-39.  
 940 <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9793>
- 941 Kramer, N., B. Pratscher, A. M. C. Meneses, W. Tschulenck, I. Walter, A. Swoboda, H. S.  
 942 Kruitwagen, K. Schneeberger, L. C. Penning, B. Spee, M. Kieslinger, S. Brandt, and I.  
 943 A. Burgener. 2020. 'Generation of Differentiating and Long-Living Intestinal Organoids  
 944 Reflecting the Cellular Diversity of Canine Intestine', *Cells*, 9.  
 945 <https://doi.org/10.3390/cells9040822>
- 946 Lacroix-Lamandé S., Wiedemann, A, 2021. Etude ex vivo des interactions hôte-pathogènes au  
 947 moyen de cultures d'organoïdes dérivés de cryptes intestinales. 6ème journée thématique  
 948 de Biotechnocentre « Cellules souches et organoïdes : réalités et perspectives » 25 juin  
 949 2021.
- 950 Lee, B. R., H. Yang, S. I. Lee, I. Haq, S. A. Ock, H. Wi, H. C. Lee, P. Lee, and J. G. Yoo. 2021.  
 951 'Robust Three-Dimensional (3D) Expansion of Bovine Intestinal Organoids: An In Vitro  
 952 Model as a Potential Alternative to an In Vivo System', *Animals (Basel)*, 11.  
 953 <https://doi.org/10.3390/ani11072115>
- 954 Li, J., J. Li, Jr., S. Y. Zhang, R. X. Li, X. Lin, Y. L. Mi, and C. Q. Zhang. 2018. 'Culture and  
 955 characterization of chicken small intestinal crypts', *Poult Sci*, 97: 1536-43.  
 956 <https://doi.org/10.3382/ps/pey010>
- 957 Li, L., F. Fu, S. Guo, H. Wang, X. He, M. Xue, L. Yin, L. Feng, and P. Liu. 2019. 'Porcine  
 958 Intestinal Enteroids: a New Model for Studying Enteric Coronavirus Porcine Epidemic  
 959 Diarrhea Virus Infection and the Host Innate Response', *J Virol*, 93.  
 960 <https://doi.org/10.1128/JVI.01682-18>
- 961 Li, X. G., M. Zhu, M. X. Chen, H. B. Fan, H. L. Fu, J. Y. Zhou, Z. Y. Zhai, C. Q. Gao, H. C.  
 962 Yan, and X. Q. Wang. 2019. 'Acute exposure to deoxynivalenol inhibits porcine enteroid  
 963 activity via suppression of the Wnt/beta-catenin pathway', *Toxicol Lett*, 305: 19-31.  
 964 <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.01.008>

- 965 Li, Y., N. Yang, J. Chen, X. Huang, N. Zhang, S. Yang, G. Liu, and G. Liu. 2020. 'Next-  
 966 generation porcine intestinal organoids: an apical-out organoid model for swine enteric  
 967 virus infection and immune response investigations', *J Virol.*  
 968 <https://doi.org/10.1128/JVI.01006-20>
- 969 Lukovac, S., C. Belzer, L. Pellis, B. J. Keijsers, W. M. de Vos, R. C. Montijn, and G. Roeselers.  
 970 2014. 'Differential modulation by *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium*  
 971 *prausnitzii* of host peripheral lipid metabolism and histone acetylation in mouse gut  
 972 organoids', *mBio*, 5. <https://doi.org/10.1128/mBio.01438-14>
- 973 Luo, H., J. Zheng, Y. Chen, T. Wang, Z. Zhang, Y. Shan, J. Xu, M. Yue, W. Fang, and X. Li.  
 974 2020. 'Utility Evaluation of Porcine Enteroids as PDCoV Infection Model in vitro', *Front*  
 975 *Microbiol*, 11: 821. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00821>
- 976 Marzorati, M., B. Vanhoecke, T. De Ryck, M. Sadaghian Sadabad, I. Pinheiro, S. Possemiers,  
 977 P. Van den Abbeele, L. Derycke, M. Bracke, J. Pieters, T. Hennebel, H. J. Harmsen, W.  
 978 Verstraete, and T. Van de Wiele. 2014. 'The HMI module: a new tool to study the Host-  
 979 Microbiota Interaction in the human gastrointestinal tract in vitro', *BMC Microbiol*, 14:  
 980 133. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-133>
- 981 Middendorp, S., K. Schneeberger, C. L. Wiegerinck, M. Mokry, R. D. Akkerman, S. van  
 982 Wijngaarden, H. Clevers, and E. E. Nieuwenhuis. 2014. 'Adult stem cells in the small  
 983 intestine are intrinsically programmed with their location-specific function', *Stem Cells*,  
 984 32: 1083-91. <https://doi.org/10.1002/stem.1655>
- 985 Min, S., S. Kim, and S. W. Cho. 2020. 'Gastrointestinal tract modeling using organoids  
 986 engineered with cellular and microbiota niches', *Exp Mol Med*, 52: 227-37.  
 987 <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0386-0>
- 988 Mussard, E., C. Pouzet, V. Helies, G. Pascal, S. Fourre, C. Cherbuy, A. Rubio, N. Vergnolle,  
 989 S. Combes, and M. Beaumont. 2020. 'Culture of rabbit caecum organoids by  
 990 reconstituting the intestinal stem cell niche in vitro with pharmacological inhibitors or L-  
 991 WRN conditioned medium', *Stem Cell Res*, 48: 101980.  
 992 <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101980>
- 993 Nash, T. J., K. M. Morris, N. A. Mabbott, and L. Vervelde. 2021. 'Inside-out chicken enteroids  
 994 with leukocyte component as a model to study host-pathogen interactions', *Commun Biol*,  
 995 4: 377. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01901-z>
- 996 Nigro, G., R. Rossi, P. H. Commere, P. Jay, and P. J. Sansonetti. 2014. 'The cytosolic bacterial  
 997 peptidoglycan sensor Nod2 affords stem cell protection and links microbes to gut  
 998 epithelial regeneration', *Cell Host Microbe*, 15: 792-8.  
 999 <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.05.003>
- 1000 Noel, G., N. W. Baetz, J. F. Staab, M. Donowitz, O. Kovbasnjuk, M. F. Pasetti, and N. C.  
 1001 Zachos. 2017. 'A primary human macrophage-enteroid co-culture model to investigate  
 1002 mucosal gut physiology and host-pathogen interactions', *Sci Rep*, 7: 45270.  
 1003 <https://doi.org/10.1038/srep45270>
- 1004 Orr, B., K. Sutton, S. Christian, T. Nash, H. Niemann, L. L. Hansen, M. J. McGrew, S. R.  
 1005 Jensen, and L. Vervelde. 2021. 'Novel chicken two-dimensional intestinal model  
 1006 comprising all key epithelial cell types and a mesenchymal sub-layer', *Vet Res*, 52: 142.  
 1007 <https://doi.org/10.1186/s13567-021-01010-z>
- 1008 Pain, B. 2021. 'Organoids in domestic animals: with which stem cells?', *Vet Res*, 52: 38.  
 1009 <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00911-3>
- 1010 Panek, M., M. Grabacka, and M. Pierzchalska. 2018. 'The formation of intestinal organoids in  
 1011 a hanging drop culture', *Cytotechnology*, 70: 1085-95. [https://doi.org/10.1007/s10616-](https://doi.org/10.1007/s10616-1012-018-0194-8)  
 1012 [018-0194-8](https://doi.org/10.1007/s10616-018-0194-8)

- 1013 Pierzchalska, M., M. Grabacka, M. Michalik, K. Zyla, and P. Pierzchalski. 2012. 'Prostaglandin  
1014 E2 supports growth of chicken embryo intestinal organoids in Matrigel matrix',  
1015 *Biotechniques*, 52: 307-15. <https://doi.org/10.2144/0000113851>
- 1016 Pierzchalska, M., M. Panek, M. Czynnek, A. Gielicz, B. Mickowska, and M. Grabacka. 2017.  
1017 'Probiotic *Lactobacillus acidophilus* bacteria or synthetic TLR2 agonist boost the growth  
1018 of chicken embryo intestinal organoids in cultures comprising epithelial cells and  
1019 myofibroblasts', *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 53: 7-18.  
1020 <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.06.002>
- 1021 Pierzchalska, M., M. Panek, M. Czynnek, and M. Grabacka. 2019. 'The Three-Dimensional  
1022 Culture of Epithelial Organoids Derived from Embryonic Chicken Intestine', *Methods*  
1023 *Mol Biol*, 1576: 135-44. [https://doi.org/10.1007/7651\\_2016\\_15](https://doi.org/10.1007/7651_2016_15)
- 1024 Powell, R. H., and M. S. Behnke. 2017. 'WRN conditioned media is sufficient for in vitro  
1025 propagation of intestinal organoids from large farm and small companion animals', *Biol*  
1026 *Open*, 6: 698-705. <https://doi.org/10.1242/bio.021717>
- 1027 Puschhof, J., C. Pleguezuelos-Manzano, A. Martinez-Silgado, N. Akkerman, A. Saftien, C.  
1028 Boot, A. de Waal, J. Beumer, D. Dutta, I. Heo, and H. Clevers. 2021. 'Intestinal organoid  
1029 cocultures with microbes', *Nat Protoc*, 16: 4633-49. [https://doi.org/10.1038/s41596-021-](https://doi.org/10.1038/s41596-021-00589-z)  
1030 [00589-z](https://doi.org/10.1038/s41596-021-00589-z)
- 1031 Rahman, S., M. Ghiboub, J. M. Donkers, E. van de Steeg, E. A. F. van Tol, T. B. M. Hakvoort,  
1032 and W. J. de Jonge. 2021. 'The Progress of Intestinal Epithelial Models from Cell Lines  
1033 to Gut-On-Chip', *Int J Mol Sci*, 22. <https://doi.org/10.3390/ijms222413472>
- 1034 Randall, K. J., J. Turton, and J. R. Foster. 2011. 'Explant culture of gastrointestinal tissue: a  
1035 review of methods and applications', *Cell Biol Toxicol*, 27: 267-84.  
1036 <https://doi.org/10.1007/s10565-011-9187-5>
- 1037 Resende, T. P., R. L. Medida, F. A. Vannucci, M. Saqui-Salces, and C. Gebhart. 2020.  
1038 'Evaluation of swine enteroids as in vitro models for *Lawsonia intracellularis*  
1039 infection1,2', *J Anim Sci*, 98. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa011>
- 1040 Rouch, J. D., A. Scott, N. Y. Lei, R. S. Solorzano-Vargas, J. Wang, E. M. Hanson, M.  
1041 Kobayashi, M. Lewis, M. G. Stelzner, J. C. Dunn, L. Eckmann, and M. G. Martin. 2016.  
1042 'Development of Functional Microfold (M) Cells from Intestinal Stem Cells in Primary  
1043 Human Enteroids', *PLoS One*, 11: e0148216.  
1044 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148216>
- 1045 Rubert, J., P. J. Schweiger, F. Mattivi, K. Tuohy, K. B. Jensen, and A. Lunardi. 2020. 'Intestinal  
1046 Organoids: A Tool for Modelling Diet-Microbiome-Host Interactions', *Trends*  
1047 *Endocrinol Metab*, 31: 848-58. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.02.004>
- 1048 Sato, T., and H. Clevers. 2013. 'Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem  
1049 cell: mechanism and applications', *Science*, 340: 1190-4.  
1050 <https://doi.org/10.1126/science.1234852>
- 1051 Sato, T., D. E. Stange, M. Ferrante, R. G. Vries, J. H. Van Es, S. Van den Brink, W. J. Van  
1052 Houdt, A. Pronk, J. Van Gorp, P. D. Siersema, and H. Clevers. 2011. 'Long-term  
1053 expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and  
1054 Barrett's epithelium', *Gastroenterology*, 141: 1762-72.  
1055 <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.050>
- 1056 Sato, T., J. H. van Es, H. J. Snippert, D. E. Stange, R. G. Vries, M. van den Born, N. Barker,  
1057 N. F. Shroyer, M. van de Wetering, and H. Clevers. 2011. 'Paneth cells constitute the  
1058 niche for *Lgr5* stem cells in intestinal crypts', *Nature*, 469: 415-8.  
1059 <https://doi.org/10.1038/nature09637>
- 1060 Sato, T., R. G. Vries, H. J. Snippert, M. van de Wetering, N. Barker, D. E. Stange, J. H. van Es,  
1061 A. Abo, P. Kujala, P. J. Peters, and H. Clevers. 2009. 'Single *Lgr5* stem cells build crypt-

- 1062 villus structures in vitro without a mesenchymal niche', *Nature*, 459: 262-5.  
 1063 <https://doi.org/10.1038/nature07935>
- 1064 Schlieve, C. R., K. L. Fowler, M. Thornton, S. Huang, I. Hajjali, X. Hou, B. Grubbs, J. R.  
 1065 Spence, and T. C. Grikscheit. 2017. 'Neural Crest Cell Implantation Restores Enteric  
 1066 Nervous System Function and Alters the Gastrointestinal Transcriptome in Human  
 1067 Tissue-Engineered Small Intestine', *Stem Cell Reports*, 9: 883-96.  
 1068 <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.07.017>
- 1069 Schreurs, Rrce, M. E. Baumdick, A. Drewniak, and M. J. Bunders. 2021. 'In vitro co-culture of  
 1070 human intestinal organoids and lamina propria-derived CD4(+) T cells', *STAR Protoc*, 2:  
 1071 100519. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100519>
- 1072 Seeger, B. 2020. 'Farm Animal-derived Models of the Intestinal Epithelium: Recent Advances  
 1073 and Future Applications of Intestinal Organoids', *Altern Lab Anim*, 48: 215-33.  
 1074 <https://doi.org/10.1177/0261192920974026>
- 1075 Seishima, R., and N. Barker. 2019. 'A contemporary snapshot of intestinal stem cells and their  
 1076 regulation', *Differentiation*, 108: 3-7. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2019.01.004>
- 1077 Siwczak, F., E. Loffet, M. Kaminska, H. Koceva, M. M. Mahe, and A. S. Mosig. 2021.  
 1078 'Intestinal Stem Cell-on-Chip to Study Human Host-Microbiota Interaction', *Front*  
 1079 *Immunol*, 12: 798552. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.798552>
- 1080 Staab, J. F., J. M. Lemme-Dumit, R. Latanich, M. F. Pasetti, and N. C. Zachos. 2020. 'Co-  
 1081 Culture System of Human Enteroids/Colonoids with Innate Immune Cells', *Curr Protoc*  
 1082 *Immunol*, 131: e113. <https://doi.org/10.1002/cpim.113>
- 1083 Stelzner, M., M. Helmrath, J. C. Dunn, S. J. Henning, C. W. Houchen, C. Kuo, J. Lynch, L. Li,  
 1084 S. T. Magness, M. G. Martin, M. H. Wong, J. Yu, and N. I. H. Intestinal Stem Cell  
 1085 Consortium. 2012. 'A nomenclature for intestinal in vitro cultures', *Am J Physiol*  
 1086 *Gastrointest Liver Physiol*, 302: G1359-63. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00493.2011>
- 1087 Stewart, A. S., J. M. Freund, and L. M. Gonzalez. 2018. 'Advanced three-dimensional culture  
 1088 of equine intestinal epithelial stem cells', *Equine Vet J*, 50: 241-48.  
 1089 <https://doi.org/10.1111/evj.12734>
- 1090 Stubbendieck, R. M., C. Vargas-Bautista, and P. D. Straight. 2016. 'Bacterial Communities:  
 1091 Interactions to Scale', *Front Microbiol*, 7: 1234.  
 1092 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01234>
- 1093 Topfer, E., A. Pasotti, A. Telopoulou, P. Italiani, D. Boraschi, M. A. Ewart, and C. Wilde. 2019.  
 1094 'Bovine colon organoids: From 3D bioprinting to cryopreserved multi-well screening  
 1095 platforms', *Toxicol In Vitro*, 61: 104606. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104606>
- 1096 Tsai, Y. H., M. Czerwinski, A. Wu, M. K. Dame, D. Attili, E. Hill, J. A. Colacino, L. M.  
 1097 Nowacki, N. F. Shroyer, P. D. R. Higgins, J. Y. Kao, and J. R. Spence. 2018. 'A Method  
 1098 for Cryogenic Preservation of Human Biopsy Specimens and Subsequent Organoid  
 1099 Culture', *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 6: 218-22 e7.  
 1100 <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.04.008>
- 1101 van der Hee, B., L. M. P. Loonen, N. Taverne, J. J. Taverne-Thiele, H. Smidt, and J. M. Wells.  
 1102 2018. 'Optimized procedures for generating an enhanced, near physiological 2D culture  
 1103 system from porcine intestinal organoids', *Stem Cell Res*, 28: 165-71.  
 1104 <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.02.013>
- 1105 van der Hee, B., O. Madsen, J. Vervoort, H. Smidt, and J. M. Wells. 2020. 'Congruence of  
 1106 Transcription Programs in Adult Stem Cell-Derived Jejunum Organoids and Original  
 1107 Tissue During Long-Term Culture', *Front Cell Dev Biol*, 8: 375.  
 1108 <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00375>
- 1109 Vergauwen, H. 2015. 'The IPEC-J2 Cell Line.' in K. Verhoeckx, P. Cotter, I. Lopez-Exposito,  
 1110 C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka and H. Wichers (eds.), *The*  
 1111 *Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models* (Cham (CH)).

1112 Wang, Y., Q. Hou, Y. Wu, Y. Xu, Y. Liu, J. Chen, L. Xu, Y. Guo, S. Gao, and J. Yuan. 2022.  
 1113 'Methionine deficiency and its hydroxy analogue influence chicken intestinal 3-  
 1114 dimensional organoid development', *Anim Nutr*, 8: 38-51.  
 1115 <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.06.001>

1116 Wang, Z., J. Li, Y. Wang, L. Wang, Y. Yin, L. Yin, H. Yang, and Y. Yin. 2020. 'Dietary vitamin  
 1117 A affects growth performance, intestinal development, and functions in weaned piglets  
 1118 by affecting intestinal stem cells', *J Anim Sci*, 98. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa020>

1119 Workman, M. J., M. M. Mahe, S. Trisno, H. M. Poling, C. L. Watson, N. Sundaram, C. F.  
 1120 Chang, J. Schiesser, P. Aubert, E. G. Stanley, A. G. Elefanty, Y. Miyaoka, M. A.  
 1121 Mandegar, B. R. Conklin, M. Neunlist, S. A. Brugmann, M. A. Helmrath, and J. M. Wells.  
 1122 2017. 'Engineered human pluripotent-stem-cell-derived intestinal tissues with a  
 1123 functional enteric nervous system', *Nat Med*, 23: 49-59. <https://doi.org/10.1038/nm.4233>

1124 Yin, L., Q. Yang, Y. Zhang, D. Wan, Y. Yin, Q. Wang, J. Huang, J. Li, H. Yang, and Y. Yin.  
 1125 2021. 'Dietary Copper Improves Intestinal Morphology via Modulating Intestinal Stem  
 1126 Cell Activity in Pigs', *Animals (Basel)*, 11. <https://doi.org/10.3390/ani11092513>

1127 Zhou, J. Y., D. G. Huang, M. Zhu, C. Q. Gao, H. C. Yan, X. G. Li, and X. Q. Wang. 2020.  
 1128 'Wnt/beta-catenin-mediated heat exposure inhibits intestinal epithelial cell proliferation  
 1129 and stem cell expansion through endoplasmic reticulum stress', *J Cell Physiol*, 235: 5613-  
 1130 27. <https://doi.org/10.1002/jcp.29492>

1131 Zietek, T., E. Rath, D. Haller, and H. Daniel. 2015. 'Intestinal organoids for assessing nutrient  
 1132 transport, sensing and incretin secretion', *Sci Rep*, 5: 16831.  
 1133 <https://doi.org/10.1038/srep16831>  
 1134