

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



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^{1,2} et Sonia Lacroix-Lamandé¹

¹ INRAE, Université de Tours, ISP, 37380 Nouzilly, France ² IRSD - Institut de Recherche en Santé Digestive, Université de Toulouse, INSERM, INRAE, ENVT, UPS, Toulouse, France

Courriel : sonia.lamande@inrae.fr

15 **Résumé**

16

6

7 8

9

10 11

12 13

14

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

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

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

- 29
- 30

31 Abstract

32

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

35

36

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



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

In this context, the development of intestinal organoids derived from stem cells represents an important technological advance in the study of intestinal physiopathology. In addition, this tool makes it possible to respond to a societal demand aiming at reducing the use of animal models in research and is part of the 3R's principle (Replacement, Reduction and Refinement). The objective of this review is, from reminders of the digestive function, to make an inventory 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

Les organoïdes intestinaux sont des structures cellulaires tridimensionnelles obtenues in vitro après auto-organisation des cellules souches cultivées avec des facteurs de croissance et de différenciation adéquats. Ces nouveaux modèles cellulaires récapitulent l'architecture et les types cellulaires de l'épithélium intestinal et conservent des fonctions similaires (Hofer and Lutolf 2021). Ils offrent donc un outil intéressant pour la caractérisation de mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'épithélium intestinal et ses interactions avec des

56 pathogènes entériques retrouvés chez les animaux d'élevage¹.

57 Introduction

58

Ces dernières années, les avancées scientifiques sur les cellules souches et en bio-ingénierie ont 59 permis de révolutionner la culture cellulaire avec un changement de dimensions de 2 (2D) à 3 60 (3D) pour améliorer la pertinence physiologique des études « in vitro ». Ainsi sont nés les 61 « organoïdes », ou mini-organes, qui permettent aujourd'hui de pouvoir reproduire au plus 62 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 molécules pharmaceutiques, pour étudier les infections, et pour la médecine régénérative/la 65 transplantation d'organes. 66

67

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

¹ 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-Lamande, and A. Wiedemann. 2021. 'Intestinal organoids in farm animals', Vet Res, 52: 33.



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

78

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

93

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

107

108

109

110

111

112

113

114



Espèce	Segment	Application	Référence
Porc	Duodenum	Stimulation avec du LPS	(Koltes and Gabler 2016)
		Edition de génome	(Engevik et al. 2020)
	Jejunum	Identification des types cellulaires	(Gonzalez et al. 2013)
	-	Culture 2D et transcriptomique	(van der Hee et al. 2018; van der Hee e
		Stimulation avec des Mycotoxines. Stress	(Li. Zhu, et al. 2019; Zhou et al. 2020)
		thermique	(,,,,,,,
		Infection par le Swine enteric virus, S.	(Li et al. 2020; Derricott et al. 2019)
		Supplémentation en cuivre	(Yin et al. 2021)
	lleum	Modèle de développement de l'intestin	(Powell and Behnke 2017: Ferrandis V
	neum		al. 2018)
		Supplémentation en Vitamine A	(Wang et al. 2020)
		Infection par Lawsonia intracellularis	(Resende et al. 2020)
	Duodenum,	Infection par le virus Porcine epidemic	(Li, Fu, et al. 2019)
	Jejunum, lleum, Colon	diarrhea virus	
Poulet	Caecum.	Modèle de développement de l'intestin	(Powell and Behnke 2017: Li et al. 201
	jejunum		(, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,
	Intestin grêle	Traitements Chimiques	(Acharya et al. 2020)
	Intestin grêle,	Modèle de développement de l'intestin,	(Panek, Grabacka, and Pierzchalska 2 Biorzeholska et al. 2017: Biorzeholska
	embryon	l actobacillus acidophilus. Infection par	al. 2012: Pierzchalska et al. 2019: Nasl
		Eimeria, Salmonella et Influenza	al. 2021; Orr et al. 2021)
Bovin	Jejunum	Infection par S. Typhimurium and T. gondii	(Derricott et al. 2019)
	-	Modèle de développement de l'intestin	(Lee et al. 2021)
	lleum	Modèle de développement de l'intestin	(Hamilton et al. 2018; Powell and Behr
		Infection par E coli Rotavirus	2017) (Fitzgerald et al. 2019: Alfaiaro et al. 20
	Colon	Culture 2D, cryoconservation	(Topfer et al. 2019)
Mouton	lleum	Modèle de développement de l'intestin	(Powell and Behnke 2017)
Cheval	lleum, 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	(Mussard et al. 2020; Kardia et al. 2027
		2D	

122 Tableau 1. Etat des lieux des organoïdes intestinaux des animaux de rente.

Tableau adapté de Beaumont et al., 2021.



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

128 1.1. Structure et fonctions du tube digestif

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

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





- 154 Figure 1. Coupe Histologique représentant la paroi de l'intestin grêle.
- L'intestin est un tube creux constitué de quatre couches: la muqueuse, la sous muqueuse, la
 musculeuse et la séreuse. L : lumière intestinale ; C : crypte
- 157

158

160

159 1.2. Composition de l'épithélium intestinal

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

171





174 Figure 2. Composition de l'épithélium intestinal.

175 L'intestin est un tube recouvert de villosités elles-mêmes recouvertes d'un épithélium monocouche. Différents types de cellules épithéliales composent cet épithélium. Dans les cryptes intestinales, se 176 177 trouvent les cellules souches Lar5+ qui prolifèrent et migrent le long de l'axe crypto-villositaire pour se différencier en cellules absorbantes que sont les entérocytes ou en cellules sécrétrices telles que les 178 179 cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines et les cellules Tuft. Les cellules de Paneth sont elles aussi des cellules différenciées mais ne migrent pas, elles restent localisées dans les cryptes et 180 constituent une niche pour les cellules souches. La prolifération des cellules ou leur différenciation 181 182 implique une régulation fine des voies de signalisation. Ainsi, la voie Wnt est fortement active dans les cryptes et favorise la prolifération et le maintien des cellules prolifératives. La voie Bmp est active 183 dans les villosités et permet la différenciation des cellules. La voie Notch est active dans les cryptes 184 au niveau des cellules progénitrices absorbantes et des cellules souches et permet notamment le choix 185 du lignage de différenciation (cellules absorbante ou sécrétrice) et le maintien de la prolifération. 186 187

188

189 a. Les villosités

190

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



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

217

219

218 b. Les cryptes ou niches des cellules souches

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

226

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

237

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

239

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



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

258

259 3. Les organoïdes intestinaux des animaux de rente

260 3.1. Les cellules souches pour cultiver des organoïdes pluripotentes

261

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

271

272 3.2. Culture des organoïdes intestinaux

273

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



généralement ensemencées dans du MatrigelTM, un gel de protéines de la matrice extracellulaire
contenant des facteurs de croissance.

286

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

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

- 306
- 307

309

308 a. Isolement des cellules souches intestinales

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
- utilisés pour l'Homme et la souris. A partir du prélèvement d'intestin du segment désiré, des
- incubation et d'agitation avec des tampons de dissociation généralement à base d'acide



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

Face à la diversité des facteurs nécessaires à la culture des organoïdes, la difficulté à obtenir

320 b. Mise en Culture des cryptes intestinales

des molécules recombinantes spécifiques de chacune des espèces animales étudiées aurait pu constituer un frein au développement de ces nouveaux modèles de culture. Toutefois, la conservation évolutive élevée des séquences en acides aminés des facteurs de croissances entre les espèces animales a rendu possible la culture d'organoïdes intestinaux à partir de facteurs humains ou murins (Panek, Grabacka, and Pierzchalska 2018; Mussard et al. 2020). Ainsi, de très nombreuses études rapportent l'utilisation du milieu conditionné de cellules L-WRN (lignée cellulaire L de souris sécrétant Wnt3a, R-spondin et Noggin, ATCC® CRL-3276TM) pour cultiver des organoïdes intestinaux de plusieurs espèces comme le poulet et le lapin (Panek, Grabacka, and Pierzchalska 2018; Mussard et al. 2020). Comme décrit précédemment, le développement des organoïdes intestinaux à partir des cellules souches est possible en inhibant la signalisation de la voie Bmp par le Noggin, en stimulant la prolifération des cellules souches épithéliales par la R-Spondin et la protéine Wnt3a, cette dernière participant également à la différenciation des cellules épithéliales. Pour faciliter la croissance des organoïdes intestinaux, le milieu peut également contenir de l'EGF, ou des suppléments de culture cellulaire

- intestinaux, le milieu peut également contenir de l'EGF, ou des suppléments de culture cellulaire
 tels que des vitamines ou des mélanges complexes commercialisés tels que les suppléments N2
 et B27.



Figure 4: Organoïdes intestinaux dérivés de cryptes jéjunales de poulet cultivés en milieu LWRN.

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



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

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

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

372 373

375

374 c. Culture dans le temps des organoïdes intestinaux

Dans tous les épithélia, la cellule épithéliale est dite « polarisée ». En effet, elle repose sur une 376 membrane basale ce qui permet de lui définir un pôle basal, en contact avec la membrane basale 377 et un pôle apical exposé au milieu « extérieur ». Cultivés en 3D dans une matrice, classiquement 378 dans du MatrigelTM, l'épithélium des organoïdes intestinaux acquiert cette caractéristique de 379 polarisation avec la partie apicale vers l'intérieur de l'organoïde. Cette orientation de 380 l'épithélium intestinal peut présenter des inconvénients à l'utilisation de ce modèle in vitro. Le 381 premier est directement relié aux caractéristiques intrinsèques de l'épithélium intestinal réputé 382 pour sa vitesse de renouvellement, qui est la plus élevée de l'organisme et qui entraîne une 383 quantité importante de cellules mortes s'accumulant dans la lumière des organoïdes classiques. 384 385 Cette accumulation excessive au cœur de l'organoïde de cellules mortes, par le phénomène d'anoïkose, nécessite de les dissocier en moyenne chaque semaine pour les maintenir dans une 386 387 culture viable. L'autre inconvénient dépend de la question scientifique pour laquelle l'outil va être utilisé. En effet, pour des études des interactions microbiote-épithélium, ou pathogènes-388 épithélium ou encore pour étudier le devenir de nutriments, l'accès au pôle apical de 389 l'épithélium est indispensable. La technique de micro-injection est un moyen d'accéder à la 390 lumière de l'organoïde, cependant, elle nécessite un appareillage et une technicité complexe qui 391 ne sont pas adaptées à tous les questionnements scientifiques et notamment aux applications à 392 haut débit (Puschhof et al. 2021). 393 394



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

- 413 épithéliales de l'organoïde intestinal.
- 414





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

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

- 423
- 424

428

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

427 4.1. Etude de la barrière intestinale

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 luminaux nocifs.

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

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



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

469

471

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

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

Ainsi, les organoïdes intestinaux des animaux de rente possèdent les types cellulaires et 488 potentiellement toutes les caractéristiques physiologiques et fonctionnelles pour étudier le 489 transport des nutriments et la production d'hormones intestinales, comme cela a déjà été réalisé 490 chez la souris ou les entéroïdes humains (Pierzchalska et al. 2017; Ferrandis Vila et al. 2018). 491 Des études fonctionnelles réalisées chez le porc ont démontré que les cellules épithéliales 492 493 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).

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



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

510

512

511 4.3. Etude des Interactions hôtes – micro-organismes

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

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

523 a.

a. Les agents infectieux étudiés

524

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

536

537 b. Les modèles d'infection

538

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

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

557

558 559

c. Etude des cellules cibles des infections

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

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

576

577 d. Etude des réponses aux infections

578

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



588 TNF- α (*Tumor necrosis factor*- α), du TGF β , de l'IL33 et de l'IFN β (*Interferon*- β) (Hellman 2021).

- 590
- 591 592

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

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

619

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

622

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



a. Co-culture avec des cellules immunitaires

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

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

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



675

674 b. Complexification par ajout de terminaisons nerveuses

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





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

706 707

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

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



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

737

738 **Conclusion**

739

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

751

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

765

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

- 770
- 771



772 **Contribution des auteurs**

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

776 **Remerciements**

- Les illustrations présentées dans cet article sont issues de travaux financés par le projet
 ANIMALT FEDER/Region Centre Val de Loire (FEDER convention EX007516, Region
 Centre 2019-00134936, programme AE-2019-1850), le projet Européen Veterinary
 Biocontained research facility Network (VETBIONET) et la Fédération de recherche en
 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.
- 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
- (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
- Acharya, M., K. Arsi, A. M. Donoghue, R. Liyanage, and N. C. Rath. 2020. 'Production and characterization of avian crypt-villus enteroids and the effect of chemicals', BMC Vet Res, 16: 179. https://doi.org/10.1186/s12917-020-02397-1
- Alfajaro, M. M., J. Y. Kim, L. Barbe, E. H. Cho, J. G. Park, M. Soliman, Y. B. Baek, M. I.
 Kang, S. H. Kim, G. J. Kim, S. I. Park, J. L. Pendu, and K. O. Cho. 2019. 'Dual
 Recognition of Sialic Acid and alphaGal Epitopes by the VP8* Domains of the Bovine
 Rotavirus G6P[5] WC3 and of Its Mono-reassortant G4P[5] RotaTeq Vaccine Strains', J
 Virol, 93. https://doi.org/10.1128/JVI.00941-19
- Ambrosini, Y. M., Y. Park, A. E. Jergens, W. Shin, S. Min, T. Atherly, D. C. Borcherding, J.
 Jang, K. Allenspach, J. P. Mochel, and H. J. Kim. 2020. 'Recapitulation of the accessible
 interface of biopsy-derived canine intestinal organoids to study epithelial-luminal
 interactions', PLoS One, 15: e0231423. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231423
- Bardenbacher, M., B. Ruder, N. Britzen-Laurent, E. Naschberger, C. Becker, R. Palmisano, M.
 Sturzl, and P. Tripal. 2020. 'Investigating Intestinal Barrier Breakdown in Living
 Organoids', J Vis Exp. https://doi.org/10.3791/60546
- Beaumont, M., F. Blanc, C. Cherbuy, G. Egidy, E. Giuffra, S. Lacroix-Lamande, and A.
 Wiedemann. 2021. 'Intestinal organoids in farm animals', Vet Res, 52: 33.
 https://doi.org/10.1186/s13567-021-00909-x
- Beaurivage, C., A. Kanapeckaite, C. Loomans, K. S. Erdmann, J. Stallen, and R. A. J. Janssen.
 2020. 'Development of a human primary gut-on-a-chip to model inflammatory processes',
 Sci Rep, 10: 21475. https://doi.org/10.1038/s41598-020-78359-2
- Bogliotti, Y. S., J. Wu, M. Vilarino, D. Okamura, D. A. Soto, C. Zhong, M. Sakurai, R. V.
 Sampaio, K. Suzuki, J. C. Izpisua Belmonte, and P. J. Ross. 2018. 'Efficient derivation of



- stable primed pluripotent embryonic stem cells from bovine blastocysts', Proc Natl Acad
 Sci U S A, 115: 2090-95. https://doi.org/10.1073/pnas.1716161115
- Chandra, L., D. C. Borcherding, D. Kingsbury, T. Atherly, Y. M. Ambrosini, A. BourgoisMochel, W. Yuan, M. Kimber, Y. Qi, Q. Wang, M. Wannemuehler, N. M. Ellinwood, E.
 Snella, M. Martin, M. Skala, D. Meyerholz, M. Estes, M. E. Fernandez-Zapico, A. E.
 Jergens, J. P. Mochel, and K. Allenspach. 2019. 'Derivation of adult canine intestinal
 organoids for translational research in gastroenterology', BMC Biol, 17: 33.
 https://doi.org/10.1186/s12915-019-0652-6
- Co, J. Y., M. Margalef-Catala, X. Li, A. T. Mah, C. J. Kuo, D. M. Monack, and M. R. Amieva.
 2019. 'Controlling Epithelial Polarity: A Human Enteroid Model for Host-Pathogen Interactions', Cell Rep, 26: 2509-20 e4. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.108
- Co, J. Y., M. Margalef-Catala, D. M. Monack, and M. R. Amieva. 2021. 'Controlling the
 polarity of human gastrointestinal organoids to investigate epithelial biology and
 infectious diseases', Nat Protoc, 16: 5171-92. https://doi.org/10.1038/s41596-021-006070
- 831 d'Aldebert, E., M. Quaranta, M. Sebert, D. Bonnet, S. Kirzin, G. Portier, J. P. Duffas, S. Chabot, P. Lluel, S. Allart, A. Ferrand, L. Alric, C. Racaud-Sultan, E. Mas, C. Deraison, and N. 832 Vergnolle. 2020. 'Characterization of Human Colon Organoids From Inflammatory 833 834 Bowel Disease Patients', Front Cell Dev Biol. 8: 363. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00363 835
- Bassing Derricott, H., L. Luu, W. Y. Fong, C. S. Hartley, L. J. Johnston, S. D. Armstrong, N. Randle,
 C. A. Duckworth, B. J. Campbell, J. M. Wastling, and J. L. Coombes. 2019. 'Developing
 a 3D intestinal epithelium model for livestock species', Cell Tissue Res, 375: 409-24.
 https://doi.org/10.1007/s00441-018-2924-9
- Butta, D., I. Heo, and R. O'Connor. 2019. 'Studying Cryptosporidium Infection in 3D Tissue derived Human Organoid Culture Systems by Microinjection', Jove-Journal of Visualized
 Experiments. https://doi.org/10.3791/59610
- Engevik, A. C., A. W. Coutts, I. Kaji, P. Rodriguez, F. Ongaratto, M. Saqui-Salces, R. L. 843 Medida, A. R. Meyer, E. Kolobova, M. A. Engevik, J. A. Williams, M. D. Shub, D. F. 844 Carlson, T. Melkamu, and J. R. Goldenring. 2020. 'Editing Myosin VB Gene to Create 845 Porcine Model of Microvillus Inclusion Disease, With Microvillus-Lined Inclusions and 846 847 Alterations in Sodium Transporters', Gastroenterology, 158: 2236-49 e9. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.034 848
- Ferrandis Vila, M., M. P. Trudeau, Y. T. Hung, Z. Zeng, P. E. Urriola, G. C. Shurson, and M.
 Saqui-Salces. 2018. 'Dietary fiber sources and non-starch polysaccharide-degrading
 enzymes modify mucin expression and the immune profile of the swine ileum', PLoS
 One, 13: e0207196. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207196
- Fitzgerald, S. F., A. E. Beckett, J. Palarea-Albaladejo, S. McAteer, S. Shaaban, J. Morgan, N.
 I. Ahmad, R. Young, N. A. Mabbott, L. Morrison, J. L. Bono, D. L. Gally, and T. N.
 McNeilly. 2019. 'Shiga toxin sub-type 2a increases the efficiency of Escherichia coli
 O157 transmission between animals and restricts epithelial regeneration in bovine
 enteroids', PLoS Pathog, 15: e1008003. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008003
- Gao, X., M. Nowak-Imialek, X. Chen, D. Chen, D. Herrmann, D. Ruan, A. C. H. Chen, M. A. 858 859 Eckersley-Maslin, S. Ahmad, Y. L. Lee, T. Kobayashi, D. Ryan, J. Zhong, J. Zhu, J. Wu, G. Lan, S. Petkov, J. Yang, L. Antunes, L. S. Campos, B. Fu, S. Wang, Y. Yong, X. 860 Wang, S. G. Xue, L. Ge, Z. Liu, Y. Huang, T. Nie, P. Li, D. Wu, D. Pei, Y. Zhang, L. Lu, 861 F. Yang, S. J. Kimber, W. Reik, X. Zou, Z. Shang, L. Lai, A. Surani, P. P. L. Tam, A. 862 Ahmed, W. S. B. Yeung, S. A. Teichmann, H. Niemann, and P. Liu. 2019. 'Establishment 863 of porcine and human expanded potential stem cells', Nat Cell Biol, 21: 687-99. 864 https://doi.org/10.1038/s41556-019-0333-2 865



- Gehart, H., and H. Clevers. 2019. 'Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells',
 Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 16: 19-34. https://doi.org/10.1038/s41575-018-0081-y
- Gonzalez, L. M., I. Williamson, J. A. Piedrahita, A. T. Blikslager, and S. T. Magness. 2013.
 'Cell lineage identification and stem cell culture in a porcine model for the study of intestinal epithelial regeneration', PLoS One, 8: e66465.
 https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066465
- Grassart, A., V. Malarde, S. Gobaa, A. Sartori-Rupp, J. Kerns, K. Karalis, B. Marteyn, P.
 Sansonetti, and N. Sauvonnet. 2019. 'Bioengineered Human Organ-on-Chip Reveals
 Intestinal Microenvironment and Mechanical Forces Impacting Shigella Infection', Cell
 Host Microbe, 26: 435-44 e4. https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.08.007
- Gribble, F. M., and F. Reimann. 2019. 'Function and mechanisms of enteroendocrine cells and
 gut hormones in metabolism', Nat Rev Endocrinol, 15: 226-37.
 https://doi.org/10.1038/s41574-019-0168-8
- Hamilton, C. A., R. Young, S. Jayaraman, A. Sehgal, E. Paxton, S. Thomson, F. Katzer, J.
 Hope, E. Innes, L. J. Morrison, and N. A. Mabbott. 2018. 'Development of in vitro enteroids derived from bovine small intestinal crypts', Vet Res, 49: 54. https://doi.org/10.1186/s13567-018-0547-5
- Hellman, S. 2021. 'Generation of equine enteroids and enteroid-derived 2D monolayers that are
 responsive to microbial mimics', Vet Res, 52: 108. https://doi.org/10.1186/s13567-02100976-0
- Heo, I., D. Dutta, D. A. Schaefer, N. Iakobachvili, B. Artegiani, N. Sachs, K. E. Boonekamp,
 G. Bowden, A. P. A. Hendrickx, R. J. L. Willems, P. J. Peters, M. W. Riggs, R. O'Connor,
 and H. Clevers. 2018. 'Modelling Cryptosporidium infection in human small intestinal
 and lung organoids', Nature Microbiology, 3: 814-+. https://doi.org/10.1038/s41564-0180177-8
- Hofer, M., and M. P. Lutolf. 2021. 'Engineering organoids', Nat Rev Mater, 6: 402-20.
 https://doi.org/10.1038/s41578-021-00279-y
- Hoffmann, P., N. Schnepel, M. Langeheine, K. Kunnemann, G. A. Grassl, R. Brehm, B. Seeger,
 G. Mazzuoli-Weber, and G. Breves. 2021. 'Intestinal organoid-based 2D monolayers
 mimic physiological and pathophysiological properties of the pig intestine', PLoS One,
 16: e0256143. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256143
- Holmberg, F. E., J. B. Seidelin, X. Yin, B. E. Mead, Z. Tong, Y. Li, J. M. Karp, and O. H.
 Nielsen. 2017. 'Culturing human intestinal stem cells for regenerative applications in the
 treatment of inflammatory bowel disease', EMBO Mol Med, 9: 558-70.
 https://doi.org/10.15252/emmm.201607260
- Holthaus, D., E. Delgado-Betancourt, T. Aebischer, F. Seeber, and C. Klotz. 2020.
 'Harmonization of Protocols for Multi-Species Organoid Platforms to Study the Intestinal Biology of Toxoplasma gondii and Other Protozoan Infections', Front Cell Infect Microbiol, 10: 610368. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.610368
- Hou, Q., L. Ye, H. Liu, L. Huang, Q. Yang, J. R. Turner, and Q. Yu. 2018. 'Lactobacillus accelerates ISCs regeneration to protect the integrity of intestinal mucosa through activation of STAT3 signaling pathway induced by LPLs secretion of IL-22', Cell Death Differ, 25: 1657-70. https://doi.org/10.1038/s41418-018-0070-2
- In, J. G., J. Foulke-Abel, M. K. Estes, N. C. Zachos, O. Kovbasnjuk, and M. Donowitz. 2016.
 'Human mini-guts: new insights into intestinal physiology and host-pathogen interactions', Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 13: 633-42. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.142
- Jalili-Firoozinezhad, S., F. S. Gazzaniga, E. L. Calamari, D. M. Camacho, C. W. Fadel, A. Bein,
 B. Swenor, B. Nestor, M. J. Cronce, A. Tovaglieri, O. Levy, K. E. Gregory, D. T. Breault,
 J. M. S. Cabral, D. L. Kasper, R. Novak, and D. E. Ingber. 2019. 'A complex human gut



- microbiome cultured in an anaerobic intestine-on-a-chip', Nat Biomed Eng, 3: 520-31.
 https://doi.org/10.1038/s41551-019-0397-0
- Jung, K. B., H. Lee, Y. S. Son, M. O. Lee, Y. D. Kim, S. J. Oh, O. Kwon, S. Cho, H. S. Cho,
 D. S. Kim, J. H. Oh, M. Zilbauer, J. K. Min, C. R. Jung, J. Kim, and M. Y. Son. 2018.
 'Interleukin-2 induces the in vitro maturation of human pluripotent stem cell-derived
 intestinal organoids', Nat Commun, 9: 3039. https://doi.org/10.1038/s41467-018-054508
- Kar, S. K., J. M. Wells, E. D. Ellen, M. F. W. Te Pas, O. Madsen, M. A. M. Groenen, and H.
 Woelders. 2021. 'Organoids: a promising new in vitro platform in livestock and veterinary
 research', Vet Res, 52: 43. https://doi.org/10.1186/s13567-021-00904-2
- Kardia, E., M. Frese, E. Smertina, T. Strive, X. L. Zeng, M. Estes, and R. N. Hall. 2021. 'Culture and differentiation of rabbit intestinal organoids and organoid-derived cell monolayers', Sci Rep, 11: 5401. https://doi.org/10.1038/s41598-021-84774-w
- Kasendra, M., A. Tovaglieri, A. Sontheimer-Phelps, S. Jalili-Firoozinezhad, A. Bein, A.
 Chalkiadaki, W. Scholl, C. Zhang, H. Rickner, C. A. Richmond, H. Li, D. T. Breault, and
 D. E. Ingber. 2018. 'Development of a primary human Small Intestine-on-a-Chip using
 biopsy-derived organoids', Sci Rep, 8: 2871. https://doi.org/10.1038/s41598-018-212017
- 934 Kim, H. J., H. Li, J. J. Collins, and D. E. Ingber. 2016. 'Contributions of microbiome and mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human 935 936 gut-on-a-chip', Proc Natl Acad Sci U S A. 113: E7-15. 937 https://doi.org/10.1073/pnas.1522193112
- Koltes, D. A., and N. K. Gabler. 2016. 'Characterization of porcine intestinal enteroid cultures
 under a lipopolysaccharide challenge1', Journal of Animal Science, 94: 335-39.
 https://doi.org/10.2527/jas.2015-9793
- Kramer, N., B. Pratscher, A. M. C. Meneses, W. Tschulenk, I. Walter, A. Swoboda, H. S. 941 Kruitwagen, K. Schneeberger, L. C. Penning, B. Spee, M. Kieslinger, S. Brandt, and I. 942 A. Burgener. 2020. 'Generation of Differentiating and Long-Living Intestinal Organoids 943 Reflecting the Cellular Diversity of Canine Intestine', Cells, 944 9. https://doi.org/10.3390/cells9040822 945
- 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.
- 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.
 'Robust Three-Dimensional (3D) Expansion of Bovine Intestinal Organoids: An In Vitro Model as a Potential Alternative to an In Vivo System', Animals (Basel), 11. https://doi.org/10.3390/ani11072115
- Li, J., J. Li, Jr., S. Y. Zhang, R. X. Li, X. Lin, Y. L. Mi, and C. Q. Zhang. 2018. 'Culture and characterization of chicken small intestinal crypts', Poult Sci, 97: 1536-43. https://doi.org/10.3382/ps/pey010
- Li, L., F. Fu, S. Guo, H. Wang, X. He, M. Xue, L. Yin, L. Feng, and P. Liu. 2019. 'Porcine
 Intestinal Enteroids: a New Model for Studying Enteric Coronavirus Porcine Epidemic
 Diarrhea Virus Infection and the Host Innate Response', J Virol, 93.
 https://doi.org/10.1128/JVI.01682-18
- 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.
 Yan, and X. Q. Wang. 2019. 'Acute exposure to deoxynivalenol inhibits porcine enteroid activity via suppression of the Wnt/beta-catenin pathway', Toxicol Lett, 305: 19-31. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.01.008



- Li, Y., N. Yang, J. Chen, X. Huang, N. Zhang, S. Yang, G. Liu, and G. Liu. 2020. 'Next-generation porcine intestinal organoids: an apical-out organoid model for swine enteric virus infection and immune response investigations', J Virol. https://doi.org/10.1128/JVI.01006-20
- Lukovac, S., C. Belzer, L. Pellis, B. J. Keijser, W. M. de Vos, R. C. Montijn, and G. Roeselers.
 2014. 'Differential modulation by Akkermansia muciniphila and Faecalibacterium
 prausnitzii of host peripheral lipid metabolism and histone acetylation in mouse gut
 organoids', mBio, 5. https://doi.org/10.1128/mBio.01438-14
- Luo, H., J. Zheng, Y. Chen, T. Wang, Z. Zhang, Y. Shan, J. Xu, M. Yue, W. Fang, and X. Li.
 2020. 'Utility Evaluation of Porcine Enteroids as PDCoV Infection Model in vitro', Front Microbiol, 11: 821. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00821
- Marzorati, M., B. Vanhoecke, T. De Ryck, M. Sadaghian Sadabad, I. Pinheiro, S. Possemiers,
 P. Van den Abbeele, L. Derycke, M. Bracke, J. Pieters, T. Hennebel, H. J. Harmsen, W.
 Verstraete, and T. Van de Wiele. 2014. 'The HMI module: a new tool to study the HostMicrobiota Interaction in the human gastrointestinal tract in vitro', BMC Microbiol, 14:
 133. https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-133
- Middendorp, S., K. Schneeberger, C. L. Wiegerinck, M. Mokry, R. D. Akkerman, S. van
 Wijngaarden, H. Clevers, and E. E. Nieuwenhuis. 2014. 'Adult stem cells in the small
 intestine are intrinsically programmed with their location-specific function', Stem Cells,
 32: 1083-91. https://doi.org/10.1002/stem.1655
- Min, S., S. Kim, and S. W. Cho. 2020. 'Gastrointestinal tract modeling using organoids
 engineered with cellular and microbiota niches', Exp Mol Med, 52: 227-37.
 https://doi.org/10.1038/s12276-020-0386-0
- Mussard, E., C. Pouzet, V. Helies, G. Pascal, S. Fourre, C. Cherbuy, A. Rubio, N. Vergnolle, 988 989 S. Combes, and M. Beaumont. 2020. 'Culture of rabbit caecum organoids by reconstituting the intestinal stem cell niche in vitro with pharmacological inhibitors or L-990 991 WRN conditioned medium'. Stem Cell Res. 48: 101980. https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101980 992
- Nash, T. J., K. M. Morris, N. A. Mabbott, and L. Vervelde. 2021. 'Inside-out chicken enteroids
 with leukocyte component as a model to study host-pathogen interactions', Commun Biol,
 4: 377. https://doi.org/10.1038/s42003-021-01901-z
- Nigro, G., R. Rossi, P. H. Commere, P. Jay, and P. J. Sansonetti. 2014. 'The cytosolic bacterial peptidoglycan sensor Nod2 affords stem cell protection and links microbes to gut epithelial regeneration', Cell Host Microbe, 15: 792-8. https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.05.003
- Noel, G., N. W. Baetz, J. F. Staab, M. Donowitz, O. Kovbasnjuk, M. F. Pasetti, and N. C.
 Zachos. 2017. 'A primary human macrophage-enteroid co-culture model to investigate
 mucosal gut physiology and host-pathogen interactions', Sci Rep, 7: 45270.
 https://doi.org/10.1038/srep45270
- Orr, B., K. Sutton, S. Christian, T. Nash, H. Niemann, L. L. Hansen, M. J. McGrew, S. R.
 Jensen, and L. Vervelde. 2021. 'Novel chicken two-dimensional intestinal model
 comprising all key epithelial cell types and a mesenchymal sub-layer', Vet Res, 52: 142.
 https://doi.org/10.1186/s13567-021-01010-z
- Pain, B. 2021. 'Organoids in domestic animals: with which stem cells?', Vet Res, 52: 38.
 https://doi.org/10.1186/s13567-021-00911-3
- Panek, M., M. Grabacka, and M. Pierzchalska. 2018. 'The formation of intestinal organoids in
 a hanging drop culture', Cytotechnology, 70: 1085-95. https://doi.org/10.1007/s10616018-0194-8



- Pierzchalska, M., M. Grabacka, M. Michalik, K. Zyla, and P. Pierzchalski. 2012. 'Prostaglandin
 E2 supports growth of chicken embryo intestinal organoids in Matrigel matrix',
 Biotechniques, 52: 307-15. https://doi.org/10.2144/0000113851
- Pierzchalska, M., M. Panek, M. Czyrnek, A. Gielicz, B. Mickowska, and M. Grabacka. 2017. 1016 1017 Probiotic Lactobacillus acidophilus bacteria or synthetic TLR2 agonist boost the growth 1018 of chicken embryo intestinal organoids in cultures comprising epithelial cells and myofibroblasts', Immunol Microbiol Infect 53: 1019 Comp Dis. 7-18. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.06.002 1020
- Pierzchalska, M., M. Panek, M. Czyrnek, and M. Grabacka. 2019. 'The Three-Dimensional Culture of Epithelial Organoids Derived from Embryonic Chicken Intestine', Methods Mol Biol, 1576: 135-44. https://doi.org/10.1007/7651_2016_15
- Powell, R. H., and M. S. Behnke. 2017. 'WRN conditioned media is sufficient for in vitro propagation of intestinal organoids from large farm and small companion animals', Biol
 Open, 6: 698-705. https://doi.org/10.1242/bio.021717
- Puschhof, J., C. Pleguezuelos-Manzano, A. Martinez-Silgado, N. Akkerman, A. Saftien, C.
 Boot, A. de Waal, J. Beumer, D. Dutta, I. Heo, and H. Clevers. 2021. 'Intestinal organoid cocultures with microbes', Nat Protoc, 16: 4633-49. https://doi.org/10.1038/s41596-021-00589-z
- Rahman, S., M. Ghiboub, J. M. Donkers, E. van de Steeg, E. A. F. van Tol, T. B. M. Hakvoort,
 and W. J. de Jonge. 2021. 'The Progress of Intestinal Epithelial Models from Cell Lines
 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
- Rouch, J. D., A. Scott, N. Y. Lei, R. S. Solorzano-Vargas, J. Wang, E. M. Hanson, M. Kobayashi, M. Lewis, M. G. Stelzner, J. C. Dunn, L. Eckmann, and M. G. Martin. 2016.
 'Development of Functional Microfold (M) Cells from Intestinal Stem Cells in Primary Human Enteroids', PLoS One, 11: e0148216.
 https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148216
- Rubert, J., P. J. Schweiger, F. Mattivi, K. Tuohy, K. B. Jensen, and A. Lunardi. 2020. 'Intestinal
 Organoids: A Tool for Modelling Diet-Microbiome-Host Interactions', Trends
 Endocrinol Metab, 31: 848-58. https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.02.004
- Sato, T., and H. Clevers. 2013. 'Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem
 cell: mechanism and applications', Science, 340: 1190-4.
 https://doi.org/10.1126/science.1234852
- Sato, T., D. E. Stange, M. Ferrante, R. G. Vries, J. H. Van Es, S. Van den Brink, W. J. Van Houdt, A. Pronk, J. Van Gorp, P. D. Siersema, and H. Clevers. 2011. 'Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium', Gastroenterology, 141: 1762-72. 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. https://doi.org/10.1038/nature09637 1059
- Sato, T., R. G. Vries, H. J. Snippert, M. van de Wetering, N. Barker, D. E. Stange, J. H. van Es,
 A. Abo, P. Kujala, P. J. Peters, and H. Clevers. 2009. 'Single Lgr5 stem cells build crypt-



villus structures in vitro without a mesenchymal niche', Nature, 459: 262-5.
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. Spence, and T. C. Grikscheit. 2017. 'Neural Crest Cell Implantation Restores Enteric 1065 Nervous System Function and Alters the Gastrointestinal Transcriptome in Human 1066 **Tissue-Engineered** Small Intestine', Stem Cell Reports, 9: 883-96. 1067 https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.07.017 1068
- Schreurs, Rrce, M. E. Baumdick, A. Drewniak, and M. J. Bunders. 2021. 'In vitro co-culture of human intestinal organoids and lamina propria-derived CD4(+) T cells', STAR Protoc, 2: 100519. https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100519
- Seeger, B. 2020. 'Farm Animal-derived Models of the Intestinal Epithelium: Recent Advances
 and Future Applications of Intestinal Organoids', Altern Lab Anim, 48: 215-33.
 https://doi.org/10.1177/0261192920974026
- Seishima, R., and N. Barker. 2019. 'A contemporary snapshot of intestinal stem cells and their
 regulation', Differentiation, 108: 3-7. https://doi.org/10.1016/j.diff.2019.01.004
- Siwczak, F., E. Loffet, M. Kaminska, H. Koceva, M. M. Mahe, and A. S. Mosig. 2021.
 'Intestinal Stem Cell-on-Chip to Study Human Host-Microbiota Interaction', Front Immunol, 12: 798552. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.798552
- Staab, J. F., J. M. Lemme-Dumit, R. Latanich, M. F. Pasetti, and N. C. Zachos. 2020. 'CoCulture System of Human Enteroids/Colonoids with Innate Immune Cells', Curr Protoc
 Immunol, 131: e113. https://doi.org/10.1002/cpim.113
- Stelzner, M., M. Helmrath, J. C. Dunn, S. J. Henning, C. W. Houchen, C. Kuo, J. Lynch, L. Li,
 S. T. Magness, M. G. Martin, M. H. Wong, J. Yu, and N. I. H. Intestinal Stem Cell
 Consortium. 2012. 'A nomenclature for intestinal in vitro cultures', Am J Physiol
 Gastrointest Liver Physiol, 302: G1359-63. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00493.2011
- Stewart, A. S., J. M. Freund, and L. M. Gonzalez. 2018. 'Advanced three-dimensional culture
 of equine intestinal epithelial stem cells', Equine Vet J, 50: 241-48.
 https://doi.org/10.1111/evj.12734
- 1090Stubbendieck, R. M., C. Vargas-Bautista, and P. D. Straight. 2016. 'Bacterial Communities:1091Interactions to Scale', Front Microbiol, 7: 1234.1092https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01234
- Topfer, E., A. Pasotti, A. Telopoulou, P. Italiani, D. Boraschi, M. A. Ewart, and C. Wilde. 2019.
 'Bovine colon organoids: From 3D bioprinting to cryopreserved multi-well screening 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. Nowacki, N. F. Shroyer, P. D. R. Higgins, J. Y. Kao, and J. R. Spence. 2018. 'A Method 1097 for Cryogenic Preservation of Human Biopsy Specimens and Subsequent Organoid 1098 1099 Culture'. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 6: 218-22 e7. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.04.008 1100
- van der Hee, B., L. M. P. Loonen, N. Taverne, J. J. Taverne-Thiele, H. Smidt, and J. M. Wells.
 2018. 'Optimized procedures for generating an enhanced, near physiological 2D culture
 system from porcine intestinal organoids', Stem Cell Res, 28: 165-71.
 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 Transcription Programs in Adult Stem Cell-Derived Jejunum Organoids and Original 1106 1107 Tissue During Long-Term Culture', Front Cell Dev Biol. 8: 375. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00375 1108
- Vergauwen, H. 2015. 'The IPEC-J2 Cell Line.' in K. Verhoeckx, P. Cotter, I. Lopez-Exposito,
 C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka and H. Wichers (eds.), The
 Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models (Cham (CH)).



- Wang, Y., Q. Hou, Y. Wu, Y. Xu, Y. Liu, J. Chen, L. Xu, Y. Guo, S. Gao, and J. Yuan. 2022.
 'Methionine deficiency and its hydroxy analogue influence chicken intestinal 3dimensional organoid development', Anim Nutr, 8: 38-51.
 https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.06.001
- Wang, Z., J. Li, Y. Wang, L. Wang, Y. Yin, L. Yin, H. Yang, and Y. Yin. 2020. 'Dietary vitamin
 A affects growth performance, intestinal development, and functions in weaned piglets
 by affecting intestinal stem cells', J Anim Sci, 98. https://doi.org/10.1093/jas/skaa020
- Workman, M. J., M. M. Mahe, S. Trisno, H. M. Poling, C. L. Watson, N. Sundaram, C. F.
 Chang, J. Schiesser, P. Aubert, E. G. Stanley, A. G. Elefanty, Y. Miyaoka, M. A.
 Mandegar, B. R. Conklin, M. Neunlist, S. A. Brugmann, M. A. Helmrath, and J. M. Wells.
 2017. 'Engineered human pluripotent-stem-cell-derived intestinal tissues with a
 functional enteric nervous system', Nat Med, 23: 49-59. https://doi.org/10.1038/nm.4233
- Yin, L., Q. Yang, Y. Zhang, D. Wan, Y. Yin, Q. Wang, J. Huang, J. Li, H. Yang, and Y. Yin.
 2021. 'Dietary Copper Improves Intestinal Morphology via Modulating Intestinal Stem
 Cell Activity in Pigs', Animals (Basel), 11. https://doi.org/10.3390/ani11092513
- Zhou, J. Y., D. G. Huang, M. Zhu, C. Q. Gao, H. C. Yan, X. G. Li, and X. Q. Wang. 2020.
 'Wnt/beta-catenin-mediated heat exposure inhibits intestinal epithelial cell proliferation and stem cell expansion through endoplasmic reticulum stress', J Cell Physiol, 235: 5613-27. https://doi.org/10.1002/jcp.29492
- Zietek, T., E. Rath, D. Haller, and H. Daniel. 2015. 'Intestinal organoids for assessing nutrient transport, sensing and incretin secretion', Sci Rep, 5: 16831.
 https://doi.org/10.1038/srep16831
- 1134