



HAL
open science

Etude du rôle des métabolites produits par le microbiote intestinal dans la santé digestive humaine et vétérinaire

Martin Beaumont

► To cite this version:

Martin Beaumont. Etude du rôle des métabolites produits par le microbiote intestinal dans la santé digestive humaine et vétérinaire. Sciences du Vivant [q-bio]. Toulouse INP, 2024. tel-04651618

HAL Id: tel-04651618

<https://hal.inrae.fr/tel-04651618v1>

Submitted on 17 Jul 2024

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.



*Mémoire présenté en vue de l'obtention de
l'habilitation à diriger des recherches (HDR)*

2024

**Etude du rôle des métabolites produits par le microbiote intestinal
dans la santé digestive humaine et vétérinaire**

Martin Beaumont

Chargé de recherche INRAE
UMR Génétique, physiologie et systèmes d'élevage (GenPhySE)
Toulouse

Composition du Jury

Hervé Acloque, *Chargé de recherche INRAE*

UMR Génétique Animale et Biologie Intégrative (GABI), Jouy-en-Josas

Ignacio Caballero, *Directeur de recherche INRAE*

UMR Infectiologie et Santé Publique (ISP), Nouzilly

Nicolas Lapaque, *Directeur de recherche INRAE*

UMR Microbiologie de l'Alimentation au service de la Santé (MICALIS), Jouy-en-Josas

Eric Houdeau, *Directeur de recherche INRAE*

UMR Toxicologie alimentaire (TOXALIM), Toulouse

Sylvie Combes, *Ingénieure de recherche INRAE*

UMR Génétique, physiologie et systèmes d'élevage (GenPhySE), Toulouse



Résumé

Le microbiote intestinal contribue au développement et à la santé de l'appareil digestif, notamment via la production de métabolites jouant le rôle d'intermédiaires moléculaires entre les bactéries et leur hôte. Les recherches présentées dans ce mémoire sont centrées sur la compréhension des effets de ces petites molécules produites par le microbiote intestinal sur les cellules digestives. Le premier axe de travail consiste à identifier les métabolites bactériens produits dans divers contextes nutritionnels. Les résultats obtenus ont notamment montré que la production de métabolites par le microbiote intestinal est modulée par l'apport en protéines chez l'homme et le rat ainsi que lors de la transition alimentaire du sevrage chez le lapin et le porc. Le deuxième axe de travail a pour but d'étudier les effets de ces métabolites bactériens sur les cellules digestives en utilisant des modèles *ex vivo* ou *in vitro*. Ainsi, des travaux chez le rongeur sur les métabolites bactériens dérivés des acides aminés ont montré que le sulfure d'hydrogène et le *p*-cresol pourraient être toxiques pour l'épithélium intestinal alors que l'indole réduit l'inflammation hépatique. Les résultats obtenus chez le lapin ont également suggéré que les métabolites produits par le microbiote intestinal lors de la transition alimentaire du sevrage pourraient contribuer à la maturation postnatale de la barrière épithéliale. Ces travaux s'accompagnent du développement de modèles de culture d'organoïdes intestinaux dans le but d'étudier les effets des métabolites bactériens sur la barrière intestinale chez le lapin et le porc. Cet axe de recherche sera poursuivi en s'appuyant sur les technologies de biologie moléculaire à l'échelle de la cellule unique dans le but de comprendre les mécanismes d'action des métabolites bactériens sur l'épithélium intestinal. Par ailleurs, l'utilisation envisagée de modèles d'intestins sur puce pourra permettre de progresser dans la modélisation *in vitro* des interactions du microbiote et de ses métabolites avec la barrière intestinale. A terme, le but de ces travaux de recherche est de développer de nouvelles stratégies de préservation de la santé digestive en ciblant les métabolites produits par le microbiote.

Remerciements

Je tiens à remercier Hervé Acloque, Ignacio Caballero, Nicolas Lapaque et Eric Houdeau d'avoir accepté de participer à mon jury d'HDR et de partager la diversité de leurs expertises sur les cellules souches, la génomique à l'échelle de la cellule unique, l'immunité innée, les interactions microbiote-épithélium et le développement de l'intestin, dans une perspective de santé humaine ou animale.

Je remercie chaleureusement Sylvie Combes pour son soutien en tant que correspondante de Toulouse INP pour cette candidature à l'HDR. Sylvie m'accompagne avec beaucoup de dynamisme depuis mon recrutement il y a 6 ans à INRAE dans l'équipe Nutrition et Ecosystèmes Digestifs (NED). D'un point de vue scientifique, elle m'a donné les moyens de m'intégrer aux thématiques de l'équipe ciblées sur le microbiote des jeunes animaux d'élevage tout en me laissant disposer d'une très grande liberté pour mettre en place mon propre axe de recherche centré sur l'épithélium intestinal. Sylvie m'a aussi fortement soutenu pour la réponse aux appels à projets, jusqu'à notre double succès de financement par l'ANR en 2022.

Les résultats obtenus depuis mon recrutement en 2018 sont issus du travail collectif de notre équipe NED que je souhaite remercier chaleureusement dans son ensemble pour le travail accompli. J'ai la chance d'avoir été recruté dans une équipe pluridisciplinaire qui regroupe des spécialistes de divers aspects de l'étude du microbiote en interaction avec son hôte animal et je voudrais remercier en particulier : Christelle Knudsen, avec qui nous partageons, en plus du bureau, de nombreux intérêts complémentaires autour de la fonction de barrière de l'intestin ; Géraldine Pascal et Laurent Cauquil, dont les compétences en bioinformatique et en analyse de données sont indispensables pour nos études autour du microbiote. Je tiens également à remercier les techniciennes de l'équipe et en particulier Corinne Lencina qui s'occupe avec beaucoup d'enthousiasme de nos cultures d'organoïdes. Je suis impatient de connaître les résultats que nous obtiendrons dans les prochaines années avec la nouvelle conformation de notre équipe lancée en 2024.

Je souhaite aussi remercier l'ensemble des étudiants que j'ai encadré depuis 2018 pour leur contribution essentielle à l'avancée de nos projets, et en particulier : Eloïse Mussard, la première doctorante que j'ai encadrée et qui a établi les fondements de nos recherches actuelles en développant au laboratoire les modèles de cultures d'organoïdes d'intestin, d'abord de lapin puis de porc ; Tania Malonga avec qui je découvre au cours de sa thèse la complexité cellulaire de l'épithélium intestinal du lapin ; Julie Alberge pour sa motivation à nous rejoindre pour un doctorat en 2024 après l'année passée dans notre équipe à cultiver des organoïdes de porcelets.

Je remercie également l'équipe pour l'ambiance chaleureuse, le respect des traditions comme le gong de 10h30, les activités insolites comme la traite de lapine, les initiatives du comité des fêtes, et bien sûr la générosité culinaire avec en tête du palmarès les gâteaux de Corinne et le buffet 100% lapin de Sylvie.

Au-delà de notre équipe, j'adresse mes remerciements à l'ensemble des membres de mon unité GenPhySE et plus particulièrement à Guillaume Devailly pour notre collaboration autour de l'épigénétique, à notre installation expérimentale PECTOUL et à nos gestionnaires pour leur contribution indispensable à la réalisation de nos projets. Je remercie aussi les équipes de direction de l'unité et du département PHASE pour leur fort soutien à mes activités. Je souhaite également remercier les nombreux collaborateurs scientifiques de nos projets, notamment Nathalie Vialaneix pour son expertise en analyse de données omiques, Gaëlle Boudry et Laura Soler pour nos intérêts communs autour de l'intestin porcin, ainsi que le groupe de travail INRAE sur les organoïdes.

Pour finir, je remercie les nombreuses personnes qui m'ont accompagné avant mon recrutement à INRAE, et en particulier mon directeur de thèse François Blachier et ma responsable de postdoc Nathalie Delzenne pour m'avoir soutenu avec beaucoup de bienveillance au début de ma carrière.

TABLE DES MATIERES

1. Curriculum vitae.....	6
2. Financements de projets de recherche	7
2.1 Financements académiques en tant que coordinateur	7
2.2 Financements académiques en tant que partenaire	8
2.3 Contrats de recherche avec des entreprises privées en tant que coordinateur	8
2.4 Contrats de recherche avec des entreprises privées en tant que partenaire	8
3. Collaborations scientifiques.....	9
3.1 Collaborations nationales (hors équipe)	9
3.2 Collaborations internationales	10
4. Activités collectives scientifiques.....	11
4.1 Participation à des réseaux scientifiques	11
4.2 Participation à l'organisation et à l'animation de congrès	11
4.3 Animation scientifique	11
4.4 Participation à des jury de concours	11
5. Activité d'expertise scientifique	11
5.1 Auprès d'agences de financement internationales	11
5.2 Auprès d'agences de financement nationales	12
5.3 Auprès de revues scientifiques (révision d'articles).....	12
6. Encadrement scientifique	12
6.1 Stages de master 2	12
6.2 Doctorats	13
6.3 Autre type d'encadrement scientifique	13
6.4 Participation à des jury de thèse	13
6.5 Participation à des jury de diplôme de l'école pratique des hautes études.....	14
6.6 Participation à des comités de thèse	14
7. Productions scientifiques.....	14
7.1 Publications en dernier auteur	14
7.2 Publications en premier auteur	15
7.3 Publications en co-auteur.....	16
7.4 Chapitre d'ouvrage	18
7.5 Conférences invitées	18
7.6 Communications orales	19
7.7 Posters	21
8. Parcours professionnel	22

9.	Bilan : activités de recherche menées depuis le doctorat (2013 – 2023)	23
9.1	Production par le microbiote intestinal de métabolites dérivés des acides aminés et conséquences pour les cellules de l’hôte.....	23
9.1.1	Modulation de l’activité métabolique du microbiote intestinal par l’apport alimentaire en protéines et conséquences pour la santé digestive.....	24
9.1.2	Effets de métabolites produits par le microbiote à partir d’acides aminés sur les cellules de l’épithélium intestinal et du foie	27
9.2	Modulation de la production de métabolites par le microbiote intestinal lors de la transition alimentaire du sevrage et conséquences pour le développement de l’intestin et la santé digestive.....	32
9.2.1	Etude de la co-maturation du microbiote intestinal et de la barrière épithéliale chez le lapin lors de l’introduction de l’alimentation solide	32
9.2.2	Etude des liens entre l’activité métabolique du microbiote et santé digestive chez les porcelets allaités ou sevrés	35
9.3	Développement de la culture d’organoïdes intestinaux pour étudier l’action du microbiote sur l’épithélium intestinal.....	39
9.3.1	Développement de la culture des organoïdes intestinaux de lapin.....	39
9.3.2	Développement de la culture des organoïdes d’intestin de porcelets	41
9.3.3	Utilisation des organoïdes d’intestin de porcelets pour étudier l’effet du microbiote primo-colonisant sur l’épithélium intestinal	46
9.3.4	Participation à des activités collectives pour le développement des modèles d’organoïdes.....	48
10.	Projet : activités de recherche en cours et perspectives	49
10.1	Compréhension à l’échelle de la cellule unique de la maturation de la barrière épithéliale intestinale lors de la transition alimentaire du sevrage	50
10.2	Etude des mécanismes d’action des métabolites bactériens contribuant à la maturation de l’épithélium intestinal au moyen d’organoïdes et d’intestins sur puce	52
10.2.1	Criblage des effets de métabolites bactériens sur l’épithélium intestinal et étude de leurs mécanismes d’action	52
10.2.2	Complexification des systèmes de culture d’organoïdes intestinaux pour étudier l’action de métabolites bactériens.....	53
10.3	Développement d’innovations nutritionnelles visant à renforcer la barrière intestinale en ciblant les métabolites produits par le microbiote	56
11.	Conclusion	60
12.	Références.....	62

1. CURRICULUM VITAE

Diplômes

2016 : **Doctorat en sciences de la nutrition** (AgroParisTech, Université Paris-Saclay)

2013 : **Diplôme d'ingénieur agronome** - spécialisation « Biotechnologies » (Agrocampus Ouest - Rennes, AgroParisTech - Paris, Wageningen University - Pays bas)

Expériences professionnelles

2018 – présent : Chargé de recherche INRAE

Laboratoire « *Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage* », Equipe « *Nutrition et Ecosystèmes Digestifs* », INRAE, Toulouse.

Etude de la contribution des métabolites produits par le microbiote intestinal à la maturation postnatale de la fonction barrière de l'épithélium digestif.

2017 : Chercheur post-doctorant

Laboratoire « *Metabolism and nutrition, Louvain drug research institute* », Université Catholique de Louvain, Bruxelles, Belgique.

Responsable scientifique : Nathalie Delzenne.

Identification de métabolites produits par le microbiote intestinal et régulant la physiologie hépatique.

2013 - 2016 : Doctorant

Laboratoire « *Physiologie de la nutrition et du comportement alimentaire* », UMR914 INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Paris.

Directeur de thèse : François Blachier.

Effets des régimes hyperprotéiques et des métabolites bactériens dérivés des acides aminés sur la muqueuse du gros intestin.

2013 (6 mois) : Stagiaire M2

Laboratoire « *Interactions de l'épithélium intestinal et du système immunitaire* », U989, INSERM, Institut Imagine, Paris.

Responsable scientifique : Nadine Cerf-Bensussan.

Caractérisation d'une voie de signalisation induite dans les entérocytes par les immunoglobulines A sécrétées lors de la maladie coeliaque.

2012 : Projet ingénieur

Laboratoire « *Interactions des bactéries commensales et probiotiques avec l'hôte* », UMR1319, MICALIS, INRA, Jouy-en-Josas.

Responsable scientifique : Muriel Thomas.

Analyse bibliographique des critères d'évaluation de l'efficacité et de la sécurité des probiotiques.

2012 (6 mois) : Stage

Laboratoire « *Physiologie de la nutrition et du comportement alimentaire* », UMR914 INRA, AgroParisTech, Paris.

Responsable scientifique : François Blachier.

Evaluation des effets d'une supplémentation en acides aminés sur la cicatrisation de la muqueuse après colite chimio-induite.

2011 (6 mois) : Stage

Laboratoire « *Biologie de la lactation* », Agriculture et Agroalimentaire Canada, Sherbrooke, Canada.

Responsable scientifique : Pierre Lacasse.

Développement de stratégies de contrôle de la sécrétion de prolactine chez les vaches laitières.

Formations complémentaires

2023 : Ecole thématique CNRS – « De la culture 3D à l'organoïde », Toulouse
2022 : 4th Workshop SincellTE (Single-Cell :Transcriptomics, Spatial and Multi-Omics) - Institut Français de bioinformatique (IFB)
2022 : EDEN22 – Ecole des doctorants et des encadrants (INRAE), Lyon
2021 : Ecole thématique CNRS – « De la culture 3D à l'organoïde », Strasbourg
2021 : Workshop « Imaging organoids », Bordeaux
2018 : Workflow4experimenters international course (Métabolomique, W4M), Institut Pasteur, Paris
2014 : Certificat d'aptitude à l'expérimentation animale de niveau 1 – Ecolé vétérinaire de Maisons Alfort (ENVA)

Prix

2023 : Lauriers INRAE « Espoir scientifique »
2016 : Prix de la meilleure communication orale (CECED, Lille, France)
2015 : Bourse de mobilité internationale (AgroParisTech)
2014 : Bourse de voyage de la société française de nutrition

2. FINANCEMENTS DE PROJETS DE RECHERCHE

2.1 Financements académiques en tant que coordinateur

2022-2025 : MetaboWean

- Cibler les métabolites dérivés du microbiote intestinal pour favoriser la maturation de la barrière épithéliale lors de la transition alimentaire du sevrage
- Agence Nationale de la Recherche (ANR JCJC) - 300 K€
- Partenaires : Emeline Lhuilier (GeT-santé, GenoToul, Toulouse), Nathalie Vialaneix (MIAT, INRAE, Toulouse)
- Financement de la thèse de Tania Malonga (2022-2025)
- 1 publication (Malonga et al., 2024)

2020-2022 : OrganoPig

- Développement d'un modèle organoïde intestinal de porcelet pour tester des stratégies innovantes pour renforcer la santé intestinale.
- Institut Carnot "France Futur Elevage" - 130 K€
- Partenaires : Laura Soler et Philippe Pinton (UMR TOXALIM, INRAE, Toulouse) et entreprise Lallemand
- Projet associé à la thèse CIFRE (entreprise Lallemand) de Eloïse Mussard (2020-2023)
- 2 publications (Mussard et al., 2022, 2023)

2020-2021 : HoloPig

- Décryptage du rôle des métabolites produits par le microbiote primocolonisant dans la programmation néonatale des cellules épithéliales intestinales chez le porcelet
- Metaprogramme HoloFlux – 50 K€
- Partenaire : Gaëlle Boudry (UMR NUMECAN, INRAE, Rennes)
- 1 publication (Beaumont et al., 2023b)

2019 : MiniGut

- Développement d'un modèle d'organoïdes d'intestin de lapin pour étudier le rôle des métabolites produits par le microbiote intestinal lors de la maturation de la barrière intestinale
- Département INRAE PHASE - 20 K€
- 1 publication (Mussard et al., 2020)

2.2 Financements académiques en tant que partenaire

2021 : **MAGICS** (Coordination Christelle Knudsen, UMR GenPhySE, INRAE, Toulouse)

- Etude de la maturation du système immunitaire chez le lapin par transcriptomique en cellule unique
- Département INRAE PHASE

2019 – 2023 : **GRAAL** (Coordination Mélanie Gunia, UMR GenPhySE, INRAE, Toulouse)

- Etude des adaptations intestinales induites par la sélection génétique pour la résistance aux maladies
- Institut Carnot France Futur Elevage et EcoAntibio

2019 : **RosePigs** (Coordination Guillaume Devailly, UMR GenPhySE, INRAE, Toulouse)

- Etude de la régulation épigénétique de l'expression de gènes impliqués dans la satiété *in vivo* et dans des organoïdes de porc
- Département INRAE GA
- 1 publication (Devailly et al., 2024)

2.3 Contrats de recherche avec des entreprises privées en tant que coordinateur

2020-2021 : **Ajinomoto** - 30 K€

- Rôle des acides aminés et des polyphénols sur la santé digestive des porcelets
- 1 publication (Beaumont et al., 2021c)

2020-2021 : **ADM** - 30 K€

- Etude des effets de la triméthylamine produite par le microbiote intestinal sur les organoïdes d'intestin de porcelet
- 1 publication (Beaumont et al., 2023a)

2.4 Contrats de recherche avec des entreprises privées en tant que partenaire

2022-2024 : **METEX** (Coordination : Nathalie Le Floc'h, UMR PEGASE, INRAE, Rennes)

- Protection des acides aminés pour cibler leur utilisation par le microbiote intestinal chez le porcelet
- Partenaires : UMR PEGASE, BIA, BIOEPAR, PFIE
- 1 publication (Beaumont et al., 2022b)

2018-2019 : **ADM** (Coordination : Sylvie Combes, UMR GenPhySE, INRAE, Toulouse)

- Activité métabolique du microbiote intestinal des porcelets allaités et sevrés
- 1 publication (Beaumont et al., 2021b)

3. COLLABORATIONS SCIENTIFIQUES

3.1 Collaborations nationales (hors équipe)

Département INRAE AlimH (Alimentation humaine)

- Gaëlle Boudry, UMR NUMECAN, INRAE, Rennes
 - Période : depuis 2020
 - Sujet : Etude du rôle du microbiote primocolonisant dans la programmation des cellules épithéliales intestinales chez le porcelet. Caractérisation du métabolisme du microbiote dans un modèle d'obésité chez la souris.
 - Financement commun : Projet Holopig (Co-coordonateurs)
 - 3 publications communes (Beaumont et al., 2023b; Guerbette et al., 2023; Mussard et al., 2023)

- Vassilia Theodorou, UMR Toxalim, INRAE, Toulouse
 - Période : 2020
 - Sujet : Etude de la perméabilité de la muqueuse caecale du lapin en chambres de Ussing
 - 1 publication commune (Beaumont et al., 2020)

Département INRAE SA (Santé Animale)

- Laura Soler, Philippe Pinton et Isabelle Oswald, UMR Toxalim, INRAE, Toulouse
 - Période : depuis 2020
 - Sujet : Développement des organoïdes intestinaux de porcs.
 - Financement commun : OrganoPig (Porteur)
 - 1 publication commune (Mussard et al., 2022)

Département INRAE PHASE (Physiologie Animale et Systèmes d'Élevage)

- Evelyne Forano, UMR MEDIS, INRAE, Clermont Ferrand
 - Période : depuis 2018
 - Sujet : Analyse du métabolome de cultures de microbiote de porcelets *in vitro* et de souches bactériennes en culture pure
 - 2 publications communes : (Gresse et al., 2021b, 2021a)

- Nathalie Le Floc'h, UMR PEGASE, INRAE, Rennes
 - Période : depuis 2021
 - Sujet : Modulation nutritionnelle de l'activité métabolique du microbiote du porcelet
 - Financement commun : Contrat de recherche avec l'entreprise METEX (Partenaire)
 - 2 publications communes (Chalvon-Demersay et al., 2021; Fraga et al., 2023)

Département INRAE GA (Génétique Animale)

- Guillaume Devailly, UMR GenPhySE, INRAE, Toulouse
 - Période : depuis 2018
 - Sujet : Etude de la régulation épigénétique de l'expression des gènes dans l'épithélium intestinal du porc *in vivo* et dans le modèle des organoïdes
 - Financements communs : Projets Holopig (Porteur), MetaboWean (Porteur), RosePigs (Partenaire)
 - 3 publications communes (Mussard et al., 2022; Beaumont et al., 2023b; Devailly et al., 2024)

- Mélanie Gunia, UMR GenPhySE, INRAE, Toulouse
 - Période : 2020-2023
 - Sujet : Etude des adaptations intestinales induites par la sélection génétique pour la résistance aux maladies chez le lapin
 - Financements communs : Projet GRAAL (Partenaire)

Département INRAE MATNUM (Mathématiques et Numérique)

- Nathalie Vialaneix, UMR MIAT, INRAE, Toulouse
 - Période : depuis 2022
 - Sujet : Etude de la maturation postnatale de l'épithélium intestinal et évaluation du rôle joué par les métabolites du microbiote : approches en cellules uniques *in vivo* et dans un modèle d'organoïdes
 - Co-encadrement de la thèse de Tania Malonga
 - Financement commun : MetaboWean (Porteur)
 - 1 publication commune (Malonga et al., 2024)

Collaboration hors INRAE

- Nathalie Vergnolle, Institut de recherche en santé digestive, INSERM, Toulouse
 - Période : 2019
 - Sujet : développement des organoïdes d'intestin de lapin
 - 1 publication commune (Mussard et al., 2020)

Collaborations avec des plateformes technologiques

- Cécile Canlet, plateforme de métabolomique AXIOM-METATOUL, Toulouse
 - Période : depuis 2018
 - Sujet : Analyses métabolomiques par résonance magnétique nucléaire
 - 3 publications communes (Beaumont et al., 2020, 2021b, 2022a)
- Emeline Lhuillier, plateforme de génomique et transcriptomique (GeT-santé), Toulouse
 - Période : depuis 2022
 - Sujet : Analyses en transcriptomique en cellules uniques de l'épithélium intestinal

3.2 Collaborations internationales

- Christian Klotz, Robert Koch Institut, Allemagne
 - Période : 2022
 - Sujet : Culture de cellules d'organoïdes d'intestin de porc en monocouches. – Séjour Agreenium pendant 3 mois de la doctorante Eloïse Mussard dans le but d'échanges technologiques.
 - 1 publication commune (Mussard et al., 2023)
- Joris Michiels, Université de Gand, Belgique et Eugeni Roura, Université de Queensland, Australie
 - Période : 2022
 - Sujet : Travail de synthèse sur l'utilisation d'acides aminés comme prébiotiques
 - 1 publication commune (Beaumont et al., 2022b)
- François Meurens, Faculté de médecine vétérinaire de l'université de Montréal, Canada
 - Période : depuis 2023
 - Sujet : Etude de l'infection de cellules épithéliales intestinales par *Streptococcus suis* dans le modèle des organoïdes intestinaux de porcs
 - Financement commun : Bourse MITACS (Canada) pour le financement d'un stage

4. ACTIVITES COLLECTIVES SCIENTIFIQUES

4.1 Participation à des réseaux scientifiques

- Depuis 2019 : Membre du groupe de travail INRAE « Organoïdes et modèles ex vivo chez les espèces animales d'intérêt agronomique »
- Depuis 2021 : Membre du groupe de travail INRAE « single cell genomics »
- Depuis 2023 : Membre du comité de pilotage du réseau INRAE - HOLOFLUX « Holobionte chez les animaux d'élevage » (HOLO-AE)

4.2 Participation à l'organisation et à l'animation de congrès

- 2019 : Animation d'une session intitulée « Microbiome host interaction and Gut health » au congrès EAAP 2019 (Ghent, Belgique)
- 2021 : Organisation d'un séminaire virtuel INRAE « Défis et perspectives d'applications des organoïdes en biologie animale »
- 2021 : Animation d'une session intitulée « Biology and physiology » au congrès World Rabbit Congress 2021 (Nantes, France)
- 2022 : Organisation d'un séminaire « Organoïdes et recherche agronomique » à l'école vétérinaire d'Alfort (<https://seminaire.inrae.fr/organoïdes/>)
- 2022 : Animation d'une session intitulée « Models and methodologies » au congrès Digestive Physiology in pigs 2022 (Rotterdam, Pays Bas)
- 2023 : Membre du comité local d'organisation de l'école thématique CNRS du GDR organoïdes. Toulouse.
- 2024 : Organisation d'un séminaire INRAE « Organoïdes et recherche agronomique »

4.3 Animation scientifique

- Organisation de l'animation scientifique hebdomadaire d'équipe (depuis 2018)
- Co-organisation de l'animation scientifique hebdomadaire de l'unité GenPhySE (depuis 2020)

4.4 Participation à des jury de concours

- 2023 : Membre de jury de concours CRCN INRAE sur profil (Chargé-e de recherche sur l'impact de la nutrition périnatale sur l'immunité et la fonction barrière intestinale)
- 2023 : Membre de jury de concours (rapporteur) Maître de Conférence ENVY (Alimentation des ruminants)
- 2024 : Membre de jury de concours CRCN INRAE sur profil (Nutrition et Santé Humaine et Physiologie animale)
- 2024 : Membre de jury de concours Maître de Conférence ENSAT (Alimentation des ruminants pour des systèmes d'élevage durables)

5. ACTIVITE D'EXPERTISE SCIENTIFIQUE

5.1 Auprès d'agences de financement internationales

- 2022 : Evaluation d'un projet RDAR – Results Driven Agriculture Research (Canada)
- 2023 : Evaluation d'une demande de subvention alliance présentée au Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie (Canada)
- 2024 : Evaluation d'une demande de subvention de bourse de thèse présentée au « Wageningen Institute of Animal Sciences » (Pays Bas)

- 2024 : Evaluation d'une demande de subvention pour le Dutch Research Council, NWO Open Competition Domain Science (Pays Bas)

5.2 Auprès d'agences de financement nationales

- 2019 : Evaluation Projet DIM ELICIT (région Ile de France)
- 2020 : Evaluation d'un projet de thèse CIFRE
- 2022 : Evaluation Appel d'Offres Interne Recherche Clinique (CHU Rennes)

5.3 Auprès de revues scientifiques (révision d'articles)

- Nature Biomedical Engineering (1 article)
- Gut (1 article)
- Biomaterials (1 article)
- BMC Biology (1 article)
- Microbiome (1 article)
- Science of total environnement (1 article)
- Npj Biofilms and microbiome (2 article)
- Animal microbiome (1 article)
- Microorganisms (1 article)
- Scientific reports (1 article)
- Frontiers in Nutrition (1 article)
- Nutrition and Metabolism (1 article)
- Journal of functional foods (1article)
- Food functions (1 article)
- Amino acids (2 articles)
- Journal of animal Physiology and Animal Nutrition (1 article)
- Journal of animal Science and Biotechnology (2 articles)
- Livestock science (1 article)
- Animal (1 article)
- Veterinary research (1 article)
- Journal of dairy science (1 article)

6. ENCADREMENT SCIENTIFIQUE

6.1 Stages de master 2

- Julie Alberge : M2 Santé digestive et nutrition (Université Toulouse), 2023, encadrant
 - Evaluation des effets du butyrate sur la barrière épithéliale intestinale en présence de déoxynivalénol dans un modèle d'organoïdes de porcelets
- Jennyfer Saucou : M2 Physiopathologie (Université Toulouse), 2023, co-encadrement avec Christelle Knudsen (UMR GenPhySE, INRAE, Toulouse)
 - Etude des adaptations intestinales induites par le sevrage précoce et la sélection génétique pour la résistance aux maladies chez le lapin
- Chloé Bredon : M2 Nutrition et Sciences des aliments (Université de Nantes), 2022, encadrant
 - Etude de l'effet de l'introduction de l'alimentation solide et d'une supplémentation en polyphénols sur la co-maturation du microbiote et de l'épithélium intestinal
- Joffrey Desplanque : M2 Santé digestive et nutrition (Université Toulouse), 2020, encadrant
 - Étude de l'effet d'une supplémentation en acides aminés ou en tannins sur la santé digestive de porcelets en post-sevrage
 - 1 publication issue du stage (Beaumont et al., 2021c)

- Eloïse Mussard : M2 Biotechnologie (Université de Limoges), 2019, encadrant
 - Développement d'un modèle d'organoïdes pour l'étude de l'action du microbiote sur l'épithélium intestinal
 - 1 publication issue du stage (Mussard et al., 2020)

6.2 Doctorats

Thèse soutenue

- Eloïse Mussard : Thèse CIFRE Lallemand, 2020-2023, co-encadrement avec Sylvie Combes (UMR GenPhySE, INRAE, Toulouse)
 - Développement et caractérisation d'un modèle d'organoïdes d'intestin de porcelets pour étudier les effets de postbiotiques sur l'épithélium intestinal
 - 2 publications issues de la thèse (Mussard et al., 2022, 2023)

Thèse en cours

- Tania Malonga : Financement ANR JCJC MetaboWean, 2022-2025, co-encadrement avec Nathalie Vialaneix (Unité MIAT, INRAE, Toulouse)
 - Etude de la maturation postnatale de l'épithélium intestinal et évaluation du rôle joué par les métabolites du microbiote : approches en cellules uniques *in vivo* et dans un modèle d'organoïdes
 - 1 publication issue de la thèse (Malonga et al., 2024)

6.3 Autre type d'encadrement scientifique

- 2019 : Allan Bertide : CDD financé par l'entreprise Néovia, co-encadrement avec Sylvie Combes (UMR GenPhySE, INRAE, Toulouse)
 - Etude du rôle du microbiote intestinal dans le développement des diarrhées post-sevrage chez le porcelet
 - 2 publications issues du CDD (Beaumont et al., 2021b, 2023a)
- 2022 : Encadrement d'un groupe de 4 étudiants (Laure Carrière, Alexis Mergez, Pierre Marchal, Laure Lamothe) en 5^e année à l'INSA de Toulouse et spécialisés en biologie computationnelle pour leur projet de bioinformatique (20h/étudiant). Co-encadrement avec Sylvie Combes (UMR GenPhySE, INRAE, Toulouse)
 - Analyse de données métagénomiques shotgun en longues lectures issues du microbiote de porcelets nouveaux nés
- 2023 : Encadrement de la thèse vétérinaire de Julie Alberge (Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse)
 - Evaluation des effets du butyrate sur la barrière épithéliale intestinale en présence de déoxyynivalénol dans un modèle d'organoïdes de porcelets

6.4 Participation à des jury de thèse

- 2022 : Examineur - Alicia Zem Fraga (Co-tutelle UNESP, Jaboticabal, Brésil et UMR PEGASE INRAE, Rennes). Adaptive responses of pigs to environmental challenge. Encadrée par Luciano Hauschild et Nathalie Le Floc'h.
- 2023 : Examineur - Rebeca Liébana-García (CSIC, Valencia, Espagne). Effect and mechanisms of action of intestinal bacteria and bioactive compounds on the immune system and metabolism in obesity models. Encadrée par Yolanda Sanz et Marta Olivares.

6.5 Participation à des jury de diplôme de l'école pratique des hautes études

- 2022 : Examinateur – Alexandra Bobet-Erny (UMR IVPC, Lyon). Développement de modèles cellulaires *in vitro* mimant l'épithélium pulmonaire pour l'étude des interactions hôte-pathogène. Encadrée par Fabienne Archer.

6.6 Participation à des comités de thèse

- 2019 : Lorraine Smith (UMR Toxalim, INRAE, Toulouse) « Impact d'une exposition alimentaire à des doses de références de pesticides sur le microbiote intestinal et le métabolisme de l'hôte ». Encadrement : Sandrine Ellero-Simatos et Laurence Payrastra
- 2020 et 2021 : Florian Touitou (UMR GenPhySE, INRAE, Toulouse) « Comprendre le lien entre l'activité des micro-organismes présents dans le rumen, le métabolisme de l'hôte et l'efficacité alimentaire des agneaux ». Encadrement : Annabelle Meynadier et Flavie Torterau
- 2021 et 2022 : Laura Frohn (UMR NUMEA, INRAE, Saint Pée-Sur-Nivelle) « La levure : un ingrédient durable pour améliorer l'efficacité des régimes à base de plante chez la truite arc-en-ciel ». Encadrement : Sandrine Skiba et Karine Pinel
- 2021 et 2022 : Raphaël Defaix (UMR NUMEA, INRAE, Saint Pée-Sur-Nivelle). « Effet des glucides alimentaires sur le microbiote intestinal et le métabolisme de l'hôte chez la truite arc-en-ciel nourrie avec un régime 100% végétal » Encadrement : Karine Ricaud, Stéphane Panserat
- 2022 et 2023 : Sarah Blanchet (UMR NUMECAN, INRAE, Rennes) « Etude de l'impact des métabolites du lait maternel dans la maturation de l'épithélium intestinal et dans le développement cérébral du nouveau-né ». Encadrement : Sophie Blat et Sergine Even
- 2023 : Céline Martin (UMR Toxalim, INRAE, Toulouse) « Effet de l'environnement sur les hépatopathies métaboliques ». Encadrement : Sandrine Ellero-Simatos et Nicolas Loiseau
- 2023 : Monique Americo (UMR MICALIS, INRAE, Jouy-en-Josas) « Etude du mécanisme d'action de *Faecalibacterium prausnitzii* via l'utilisation d'organoïdes ». Encadrement : Jean-Marc Chatel.
- 2024 : Gabriel Vimont (UMR NUMECAN, INRAE, Rennes) « Dysfonction mitochondriale des cellules épithéliales intestinales dans l'obésité : origines et conséquences sur la fonction intestinale ». Encadrement : Gaëlle Boudry et Annaïg Lan
- 2024 : Maurane Grondin (UMR PEGASE, INRAE, Rennes). « Ingrédients innovants à base de pois : impact sur les fonctions digestives et la croissance des porcelets ». Encadrement : Myriam Grundy et Frédéric Dessauge

7. PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

45 publications dans des journaux internationaux à comité de relecture (4 en dernier auteur, 13 en premier auteur et 28 en co-auteur) – 2563 Citations - H-index 25 (source : Google scholar). [Les publications issues des travaux menés depuis le recrutement en tant que CRCN INRAE en 2018 sont indiquées en bleu.](#)

7.1 Publications en dernier auteur

1. Malonga, T., Vialaneix, N., **Beaumont, M.** (2024). BEST4⁺ cells in the intestinal epithelium. *Am J Physiol-Cell Physiol*.
2. Mussard, E., Lencina, C., Boudry, G., Achard, C.S., Klotz, C., Combes, S., **Beaumont, M.** (2023) Culture of Piglet Intestinal 3D Organoids from Cryopreserved Epithelial Crypts and Establishment of Cell Monolayer. *Journal of Visualized Experiments (JOVE)*.
3. Mussard, E., Lencina, C., Gallo, L., Barilly, C., Poli, M., Fève, K., Albin, M., Cauquil, L., Knudsen, C., Achard, C., Devailly, G., Soler, L., Combes, S., **Beaumont, M.** (2022) The phenotype of the gut

region is more stably retained than developmental stage in piglet intestinal organoids. *Front Cell Dev Biol.*

4. Mussard, E., Pouzet, C., Helies, V., Pascal, G., Fourre, S., Cherbuy, C., Rubio, A., Vergnolle, N., Combes, S., and **Beaumont, M.** (2020) Reconstitution of intestinal stem cell niche in vitro with pharmacological inhibitors or L-WRN conditioned medium differentially regulates epithelial proliferation, differentiation and barrier function in rabbit caecum organoids. *Stem Cell Research* 48.

7.2 **Publications en premier auteur**

1. **Beaumont M.**, Lencina C., Fève K., Barilly C., Le-Normand L., Combes S., Devailly G., Boudry G (2023). Disruption of the primocolonizing microbiota alters epithelial homeostasis and imprints stem cells in the colon of neonatal piglets. *Faseb J.*
2. **Beaumont M.**, Lencina C., Bertide A., Gallo L., Barilly C., Marraud C., Cauquil C., Samson A., Combes S (2023). The Early Life Microbiota Is Not a Major Factor Underlying the Susceptibility to Postweaning Diarrhea in Piglets. *Microbiol Spectr*, e0069423
3. **Beaumont M.**, Roura E., Lambert W., Turni C., Michiels J., Chalvon-Demersay T. (2022) Selective nourishing of gut microbiota with amino acids: A novel prebiotic approach? *Front Nutr*
4. **Beaumont M.**, Mussard E., Barilly C., Lencina C., Gress L., Painteaux L., Gabinaud B., Cauquil L., Aymard P., Canlet C., Paës C., Knudsen C., Combes S. (2022) Developmental Stage, Solid Food Introduction, and Suckling Cessation Differentially Influence the Comaturation of the Gut Microbiota and Intestinal Epithelium in Rabbits. *J Nutr*
5. **Beaumont M.**, Lencina C., Painteaux L., Viémond-Desplanque J., Phornlaphat O., Lambert W., Chalvon-Demersay T. (2022) A mix of functional amino acids and grape polyphenols promotes the growth of piglets, modulates the gut microbiota in vivo and regulates epithelial homeostasis in intestinal organoids. *Amino Acids*
6. **Beaumont, M.**, Blanc, F., Cherbuy, C., Egidy, G., Giuffra, E., Lacroix-Lamandé, S., Wiedemann, A. (2021). Intestinal organoids in farm animals. *Vet. Res.*
7. **Beaumont, M.**, Cauquil, L., Bertide, A., Ahn, I., Barilly, C., Gil, L., Canlet, C., Zemb, O., Pascal, G., Samson, A., and Combes, S. (2021). Gut Microbiota-Derived Metabolite Signature in Suckling and Weaned Piglets. *J. Proteome Res.* 20, 982–994.
8. **Beaumont, M.**, Paës, C., Mussard, E., Knudsen, C., Cauquil, L., Aymard, P., Barilly, C., Gabinaud, B., Zemb, O., Fourre, S., Gautier, R., Lencina, C., Eutamène, H., Theodorou, V., Canlet, C., and Combes, S. (2020) Gut microbiota derived metabolites contribute to intestinal barrier maturation at the suckling-to-weaning transition. *Gut Microbes* 11, 1268–1286
9. **Beaumont, M.**, Neyrinck, A. M., Olivares, M., Rodriguez, J., de Rocca Serra, A., Roumain, M., Bindels, L. B., Cani, P. D., Evenepoel, P., Muccioli, G. G., Demoulin, J.-B., and Delzenne, N. M. (2018) The gut microbiota metabolite indole alleviates liver inflammation in mice. *FASEB J.* fj201800544
10. **Beaumont, M.**, Portune, K. J., Steuer, N., Lan, A., Cerrudo, V., Audebert, M., Dumont, F., Mancano, G., Khodorova, N., Andriamihaja, M., Airinei, G., Tomé, D., Benamouzig, R., Davila, A.-M., Claus, S. P., Sanz, Y., and Blachier, F. (2017) Quantity and source of dietary protein influence metabolite production by gut microbiota and rectal mucosa gene expression: a randomized, parallel, double-blind trial in overweight humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 106, 1005–1019

11. **Beaumont, M.**, Andriamihaja, M., Armand, L., Grauso, M., Jaffrézic, F., Laloë, D., Moroldo, M., Davila, A.-M., Tomé, D., Blachier, F., and Lan, A. (2017) Epithelial response to a high-protein diet in rat colon. *BMC Genomics* 18, 116
12. **Beaumont, M.**, Jaoui, D., Douard, V., Mat, D., Koeth, F., Goustard, B., Mayeur, C., Mondot, S., Hovaghimian, A., Le Feunteun, S., Chaumontet, C., Davila, A.-M., Tomé, D., Souchon, I., Michon, C., Fromentin, G., Blachier, F., and Leclerc, M. (2017) Structure of protein emulsion in food impacts intestinal microbiota, caecal luminal content composition and distal intestine characteristics in rats. *Mol Nutr Food Res* 61
13. **Beaumont, M.**, Andriamihaja, M., Lan, A., Khodorova, N., Audebert, M., Blouin, J.-M., Grauso, M., Lancha, L., Benetti, P.-H., Benamouzig, R., Tomé, D., Bouillaud, F., Davila, A.-M., and Blachier, F. (2016) Detrimental effects for colonocytes of an increased exposure to luminal hydrogen sulfide: The adaptive response. *Free Radic. Biol. Med.* 93, 155–164

7.3 Publications en co-auteur

1. Devailly, G., Feve, K., Saci, S., Sarry, J., Valière, S., Lluch, J., Bouchez, O., Ravon, L., Billon, Y., Gilbert, H., Riquet, J., **Beaumont, M.**, Demars, J. (2024) Divergent Selection for Feed Efficiency in Pigs Altered the Duodenum Transcriptomic Response to Feed Intake and Its DNA Methylation Profiles. *Physiol Genomics*.
2. Yvon S., **Beaumont M.**, Dayonnet A., Eutamène H., Lambert W., Tondereau V., Chalvon-Demersay T., Belloir P., Paës C. (2024) Effect of diet supplemented with functional amino acids and polyphenols on gut health in broilers subjected to a corticosterone-induced stress. *Sci Rep* 14:1032.
3. Guerbette, T.; **Beaumont, M.**; Andriamihaja, M.; Ciesielski, V.; Perrin, J.-B.; Janvier, R.; Randuineau, G.; Leroyer, P.; Loréal, O.; Rioux, V.; Boudry, G.; Lan, A. (2023) Obesogenic Diet Leads to Luminal Overproduction of the Complex IV Inhibitor H₂S and Mitochondrial Dysfunction in Mouse Colonocytes. *The FASEB Journal*, 37 (4), e22853.
4. Fraga, AZ., Campos, PHRF., Hauschild, L., Chalvon-Demersay, T., **Beaumont, M.**, Le Floc'h, N. (2023) A blend of functional amino acids and grape polyphenols improves the pig capacity to cope with an inflammatory challenge caused by poor hygiene of housing conditions. *BMC Vet Res*
5. Paës, C., Gidenne, T., Bébin, K., Duperray, J., Gohier, C., Guené-Grand, E., Rebours, G., Barilly, C., Gabinaud, B., Cauquil, L., Castinel, A., Pascal, G., Darbot, V., Aymard, P., Debrusse, A.M., **Beaumont, M.**, Combes, S. (2022) Early Introduction of Plant Polysaccharides Drives the Establishment of Rabbit Gut Bacterial Ecosystems and the Acquisition of Microbial Functions. *mSystems*
6. Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Garrido, J.J., Denis, S., Jiménez-Marín, A., **Beaumont, M.**, Van de Wiele, T., Forano, E., Blanquet-Diot S. (2021) Pathogen Challenge and Dietary Shift Alter Microbiota Composition and Activity in a Mucin-Associated in vitro Model of the Piglet Colon (MPigut-IVM) Simulating Weaning Transition. *Front Microbiol.*
7. Chalvon-Demersay, T., Luise, D., Le Floc'h, N., Tesseraud, S., Lambert, W., Bosi, P., Trevisi, P., **Beaumont, M.**, Corrent, E. (2021) Functional Amino Acids in Pigs and Chickens: Implication for Gut Health. *Front Vet Sci.*
8. Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Denis, S., **Beaumont, M.**, Van de Wiele, T., Forano, E., Blanquet-Diot, S. (2021) Weaning-associated feed deprivation stress causes microbiota disruptions in a novel mucin-containing in vitro model of the piglet colon (MPigut-IVM). *J Anim Sci Biotechnol*

9. Matysik, S., Krautbauer, S., Liebisch, G., Schött, H.F., Kjølbæk, L., Astrup, A., Blachier, F., **Beaumont, M.**, Nieuwdorp, M., Hartstra, A., Rampelli, S., Pagotto, U., Lozzo, P. (2021) Short chain fatty acids and bile acids in human faeces are associated with the intestinal cholesterol conversion status. *British Journal of Pharmacology*.
10. Knudsen, C., Neyrinck, A., Leyrolle, Q., Leclercq, S., Rodriguez, J., **Beaumont, M.**, Cani, P., Bindels, L., Lanthier, N. and Delzenne, N. (2021) The microbial metabolite indole inhibits hepatic injury and inflammation in leptin-deficient obese mice. *Journal of Nutrition*.
11. Delzenne, N. M., Olivares, M., Neyrinck, A. M., **Beaumont, M.**, Kjølbæk, L., Larsen, T. M., Benítez-Páez, A., Román-Pérez, M., Garcia-Campayo, V., Bosscher, D., Sanz, Y., and van der Kamp, J.-W. (2020) Nutritional interest of dietary fiber and prebiotics in obesity: Lessons from the MyNewGut consortium. *Clinical Nutrition* 39, 414–424
12. Delzenne, N. M., Knudsen, C., **Beaumont, M.**, Rodriguez, J., Neyrinck, A. M., and Bindels, L. B. (2019) Contribution of the gut microbiota to the regulation of host metabolism and energy balance: a focus on the gut–liver axis. *Proceedings of the Nutrition Society* 78, 319–328
13. Cires, M. J., Navarrete, P., Pastene, E., Carrasco-Pozo, C., Valenzuela, R., Medina, D. A., Andriamihaja, M., **Beaumont, M.**, Blachier, F., and Gotteland, M. (2019) Effect of a proanthocyanidin-rich polyphenol extract from avocado on the production of amino acid-derived bacterial metabolites and the microbiota composition in rats fed a high-protein diet. *Food Funct.* 10, 4022–4035
14. Cires, M. J., Navarrete, P., Pastene, E., Carrasco-Pozo, C., Valenzuela, R., Medina, D. A., Andriamihaja, M., **Beaumont, M.**, Blachier, F., and Gotteland, M. (2019) Protective Effect of an Avocado Peel Polyphenolic Extract Rich in Proanthocyanidins on the Alterations of Colonic Homeostasis Induced by a High-Protein Diet. *J. Agric. Food Chem.* 67, 11616–11626
15. Blachier, F., **Beaumont, M.**, Portune, K. J., Steuer, N., Lan, A., Audebert, M., Khodorova, N., Andriamihaja, M., Airinei, G., Benamouzig, R., Davila, A.-M., Armand, L., Rampelli, S., Brigidi, P., Tomé, D., Claus, S. P., and Sanz, Y. (2019) High-protein diets for weight management: Interactions with the intestinal microbiota and consequences for gut health. A position paper by the my new gut study group. *Clinical Nutrition* 38, 1012–1022
16. Blachier, F., **Beaumont, M.**, and Kim, E. (2019) Cysteine-derived hydrogen sulfide and gut health: a matter of endogenous or bacterial origin. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 22, 68–75
17. Sanz, Y., Román-Pérez, M., Benítez-Páez, A., Portune, K. J., Brigidi, P., Rampelli, S., Dinan, T., Stanton, C., Delzenne, N., Blachier, F., Neyrinck, A. M., **Beaumont, M.**, Olivares, M., Holzer, P., Günther, K., Wolters, M., Ahrens, W., Claus, S. P., Campoy, C., Murphy, R., Sadler, C., Fernández, L., and Kamp, J.-W. van der. (2018) Towards microbiome-informed dietary recommendations for promoting metabolic and mental health: Opinion papers of the MyNewGut project. *Clin Nutr*
18. Olivares, M., Schüppel, V., Hassan, A. M., **Beaumont, M.**, Neyrinck, A. M., Bindels, L. B., Benítez-Páez, A., Sanz, Y., Haller, D., Holzer, P., and Delzenne, N. M. (2018) The Potential Role of the Dipeptidyl Peptidase-4-Like Activity From the Gut Microbiota on the Host Health. *Front. Microbiol.* 9
19. Olivares, M., Neyrinck, A. M., Pötgens, S. A., **Beaumont, M.**, Salazar, N., Cani, P. D., Bindels, L. B., and Delzenne, N. M. (2018) The DPP-4 inhibitor vildagliptin impacts the gut microbiota and prevents disruption of intestinal homeostasis induced by a Western diet in mice. *Diabetologia* 61, 1838–1848

20. Andriamihaja, M., Lan, A., **Beaumont, M.**, Grauso, M., Gotteland, M., Pastene, E., Cires, M. J., Carrasco-Pozo, C., Tomé, D., and Blachier, F. (2018) Proanthocyanidin-containing polyphenol extracts from fruits prevent the inhibitory effect of hydrogen sulfide on human colonocyte oxygen consumption. *Amino Acids* 50, 755–763
21. Oberli, M., Douard, V., **Beaumont, M.**, Jaoui, D., Devime, F., Laurent, S., Chaumontet, C., Mat, D., Le Feunteun, S., Michon, C., Davila, A.-M., Fromentin, G., Tomé, D., Souchon, I., Leclerc, M., Gaudichon, C., and Blachier, F. (2018) Lipo-Protein Emulsion Structure in the Diet Affects Protein Digestion Kinetics, Intestinal Mucosa Parameters and Microbiota Composition. *Mol Nutr Food Res* 62
22. Blachier, F., **Beaumont, M.**, Andriamihaja, M., Davila, A.-M., Lan, A., Grauso, M., Armand, L., Benamouzig, R., and Tomé, D. (2017) Changes in the Luminal Environment of the Colonic Epithelial Cells and Physiopathological Consequences. *Am. J. Pathol.* 187, 476–486
23. Vidal-Lletjós, S., **Beaumont, M.**, Tomé, D., Benamouzig, R., Blachier, F., and Lan, A. (2017) Dietary Protein and Amino Acid Supplementation in Inflammatory Bowel Disease Course: What Impact on the Colonic Mucosa? *Nutrients* 9
24. Portune, K. J., **Beaumont, M.**, Davila, A.-M., Tomé, D., Blachier, F., and Sanz, Y. (2016) Gut microbiota role in dietary protein metabolism and health-related outcomes: The two sides of the coin. *Trends in Food Science & Technology* 57, 213–232
25. Andriamihaja, M., Lan, A., **Beaumont, M.**, Audebert, M., Wong, X., Yamada, K., Yin, Y., Tomé, D., Carrasco-Pozo, C., Gotteland, M., et al. (2015). The deleterious metabolic and genotoxic effects of the bacterial metabolite p-cresol on colonic epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 85, 219–227.
26. Miquel, S., **Beaumont, M.**, Martín, R., Langella, P., Braesco, V., and Thomas, M. (2015). A proposed framework for an appropriate evaluation scheme for microorganisms as novel foods with a health claim in Europe. *Microb. Cell Fact.* 14, 48.
27. Lan, A., Blachier, F., Benamouzig, R., **Beaumont, M.**, Barrat, C., Coelho, D., Lancha, A., Kong, X., Yin, Y., Marie, J.-C., et al. (2015). Mucosal Healing in Inflammatory Bowel Diseases: Is There a Place for Nutritional Supplementation? *Inflamm Bowel Dis* 21, 198–207.
28. Liu, X., **Beaumont, M.**, Walker, F., Chaumontet, C., Andriamihaja, M., Matsumoto, H., Khodorova, N., Lan, A., Gaudichon, C., Benamouzig, R., et al. (2013). Beneficial effects of an amino acid mixture on colonic mucosal healing in rats. *Inflamm. Bowel Dis.* 19, 2895–2905.

7.4 Chapitre d’ouvrage

1. **Beaumont, M.** and Blachier, F. (2020) Amino Acids in Intestinal Physiology and Health. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1265, 1–20

7.5 Conférences invitées

1. **Beaumont M.** Study of the pig intestinal epithelium using organoids (2023). Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center – Université de Montréal (Canada).
2. **Beaumont M.** Intestinal organoids: innovative in vitro tools to study host-microbiota interactions in farm animals (2023). EuroFAANG – Summer school “Support the 3Rs (Replacement, Reduction and Refinement) through the use of organoids”, Jouy-en-Josas.

3. **Beaumont M.** Interaction between amino acids and the gut microbiota (2021) 2nd Amino Acid Academy organized by Ajinomoto Animal Nutrition Group & European Federation of Animal Science (EAAP) - Paris, France.
4. **Beaumont M.,** Mussard, E., Combes, S. Intestinal organoids: innovative in vitro tools to study host microbiota interactions in livestock (2020). 71th meeting of the European Federation of Animal Science (EAAP) - Virtual meeting.
5. **Beaumont M.** Rôle clé des métabolites bactériens dans l'action du microbiote intestinal sur son hôte (2020). Journées Francophones de Nutrition (JFN) - Virtual meeting.
6. **Beaumont M.** Le microbiote intestinal : un acteur central de la nutrition et de la santé des animaux (2019). French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) - Paris, France (*In French*).
7. **Beaumont M.** Importance des métabolites bactériens dans le dialogue entre le microbiote intestinal et son hôte (2018). Conference of physiology and integrative biology - Lille, France.

7.6 Communications orales

2024

Malonga T., Knudsen K., Lhuillier E., Aymard P., Riant E., Cabau C., Vialaneix N., **Beaumont M.** La transcriptomique en cellule unique révèle les processus de maturation induits dans chaque type de cellule épithéliale intestinale lors de l'introduction de l'alimentation solide. *Club d'étude des cellules épithéliales digestives (CECED) 2024* Montpellier, France.

2023

Beaumont M., Mussard E., Lencina L., Achard C., Combes S. Intérêt des organoïdes intestinaux de porcelet pour étudier l'immunité innée épithéliale. *Symposium du club d'immunologie et de vaccinologie vétérinaires, 2023*, Toulouse

Beaumont M., Bredon C., Barilly C., Lencina C., Gallo L., Aymard P., Knudsen C., **Combes S.** Une supplémentation en polyphénols module la maturation du microbiote et de l'épithélium intestinal lors de l'introduction de l'alimentation solide. *Journées de recherche cunicole, 2023*, Le Mans.

Combes S., Helies V., Paccanelli M., Lille-Laroucau C., Ruesche J., Poly M., Rumeau M., **Beaumont M.,** Knudsen C., Chollet S., Fenaille F. Variabilité de la composition en oligosaccharides du lait et lien avec la carrière reproductive des lapines. *Journées de recherche cunicole, 2023*, Le Mans.

2022

Beaumont M., Mussard E., Lencina C., Fève K., Boudry G., Devailly G. Etude du rôle de modifications épigénétiques dans le maintien de profils d'expression de gènes observés in vivo dans des organoïdes d'intestin de porcelets. *Séminaire organoïdes INRAE 2022*, Paris, France.

Mussard E., Lencina C, Gallo L, Barilly C., Poli M., Albin M., Cauquil L., Knudsen C., Achard C., Devailly G., Soler L., Combes S., **Beaumont M.** Characterization of an organoid model to study the intestinal epithelium in piglets. *Digestive physiology in pigs (DPP) 2022*, Rotterdam, Pays bas.

Beaumont M., Gallo L., Gress L., Fève K., Le-Normand L., Perrot E., Laraqui S., Gevailly G., Boudry G. La perturbation du microbiote néonatal modifie l'homéostasie épithéliale et induit une empreinte dans les cellules souches du côlon chez le porcelet. *Club d'étude des cellules épithéliales digestives (CECED) 2022* Lyon, France.

Guerbette T., Beaumont M., Randuineau G., Leoryer P., Loreal O., Boudry G., Lan A. Modifications de l'environnement luminal et dysfonction mitochondriale des cellules épithéliales coliques chez la souris obèse. *Club d'étude des cellules épithéliales digestives (CECED) 2022 Lyon, France.*

Beaumont M., Lencina C., Viémond-Desplanques J., Chalvon-Demersay T. Effets bénéfiques des acides aminés et des polyphénols chez le porcelet : approche in vivo et organoïdes. *Journées de la recherche porcine (JRP) 2022, Virtuel.*

2021

Mussard, E., Pouzet, C., Helies, V., Pascal, G., Fourre, S., Cherbuy, C., Rubio, A., Vergnolle, N., Combes, S., et Beaumont, M. Développement d'un modèle d'organoïdes de caecum de lapin. *Séminaire Organoïdes INRAE 2021, Virtuel.*

Mussard E, Lencina C, Gallo L, Barilly C., Poli M., Albin M., Cauquil L., Knudsen C., Achard C., Devailly G., Soler L., Combes S., Beaumont M. Création et phénotypage d'une biobanque d'organoïdes d'intestin de porcelets. *Séminaire Organoïdes INRAE 2021, Virtuel.*

Beaumont M., Lencina C., Viémond-Desplanques J., Chalvon-Demersay T. In vivo and organoid experiments reveal beneficial effects of amino acids and polyphenols in piglets. *EAAP 2021, Davos, Suisse*

Beaumont M., Mussard E., Barilly C., Lencina C., Gress L., Painteaux L., Gabinaud B., Cauquil L., Aymard P., Canlet C., Paës C., Knudsen C., Combes S. Age, solid food introduction and suckling cessation differentially influence the maturation of the gut microbiota and intestinal epithelium in early life. *12th International Symposium on Gut Microbiology, 2021, virtuel.*

Mussard, E., Pouzet, C., Helies, V., Pascal, G., Fourre, S., Cherbuy, C., Rubio, A., Vergnolle, N., Combes, S., et Beaumont, M. Development of a rabbit caecum organoid model: an innovative in vitro tool to study absorptive and barrier functions of epithelial cells. *World Rabbit Congress 2021, Nantes, France.*

2019

Beaumont M., Paës C., Cauquil L., Aymard P., Barilly C., Bouchez O., Canlet C., Combes S. L'ingestion d'aliments solides au début de la vie induit la co-maturation du microbiote et de la barrière intestinale. *CECED (Club d'Etude des Cellules Epithéliales Digestives), 2019, Toulouse.*

Beaumont M. Rôle des modifications épigénétiques dans l'action du microbiote intestinal sur son hôte. *EpiPHASE « 5eme journée d'animation scientifique autour de l'épigénétique », 2019, Toulouse.*

Beaumont M., Gabriel I. Explorer les fonctionnalités du microbiote pour comprendre son action sur son hôte animal : apports de la métaprotéomique et de la métabolomique. *Réseau microbiote Volaille, 2019, Paris.*

Beaumont M., Paës C., Mussard E., Lamothe L., Gidenne T., Cauquil L., Pascal G., Aymard P., Barilly C., Gabinaud B., Combes S. Stimuler l'ingestion d'aliments solides au début de la vie: une stratégie prometteuse pour piloter la co-maturation du microbiote et de la muqueuse intestinale. *Séminaire Défis Scientifiques, Département de Physiologie Animale et Systèmes d'Élevage. 2019, Rennes.*

2018

Beaumont M. Intérêts et limites du « test des eaux fécales *in vitro* » pour comprendre comment le microbiote agit sur la muqueuse intestinale via la production de métabolites. *Journée d'animation NEM (nutrition et écosystèmes microbiens), 2018, Narbonne.*

Beaumont M. Intérêts et limites du modèle des “precision cut liver slices” pour étudier le rôle du microbiote dans la physiologie hépatique. *Journée d’animation du département MICA sur les modèles ex vivo d’étude des relations hôte/microbiote*, 2018, Paris.

Beaumont M. Importance des métabolites bactériens dans le dialogue entre le microbiote et son hôte. *Congrès de Physiologie et de Biologie Intégrative*, 2018, Lille.

7.7 Posters

2024

Alberge J., Mussard E., Al-Ayoubi C., Lencina C., Achard C., Cauquil L., Oswald I., Soler L., Combes S., Beaumont M. Le butyrate réduit la dysfonction de la barrière épithéliale induite par la mycotoxine déoxynivalénol dans un modèle d’organoïdes d’intestin de porcelets. *Club d’étude des cellules épithéliales digestives (CECED)*, 2024, Montpellier, France.

2022

Knudsen K., Martins F., Cabau C., Zakaroff A., Riant E., Gallo L., Aymard P., Combes S., Beaumont M. Single cell RNA-sequencing reveals the diversity of the lamina propria CD45+ cells in rabbit caecum. International conference for mucosal immunology (ICMI), 2022, Seattle, USA.

Beaumont M., Bredon C., Barilly C., Lencina C., Gallo L., Aymard P., Knudsen C., Combes S. Une supplémentation en polyphénols module la maturation du microbiote et de l’épithélium intestinal lors de l’introduction de l’alimentation solide. Journées francophones de nutrition (JFN), 2022, Toulouse.

Beaumont M., Lencina C., Gallo L., Barilly C., Samson A., Combes S. Effets de métabolites produits par le microbiote intestinal sur des organoïdes de côlon de porcelets. *Séminaire organoïdes INRAE 2022*, Paris, France.

Beaumont M., Gallo L., Gress L., Fève K., Le-Normand L., Perrot E., Laraqui S., Gevailly G., Boudry G. Modification of the neonatal microbiota alters epithelial homeostasis and imprints stem cells in the colon of piglets. Digestive physiology in pigs (DPP) 2022, Rotterdam, Pays bas.

Gresse R., Chaucheyras-Durand F., Denis S., Garrido J., Jimenez A., Beaumont M., Achard C., Van de Wiele T., Forano E., Blanquet-Diot S. A live probiotic yeast reduces inflammatory response of porcine intestinal cell lines exposed to effluents of a piglet colonic fermentation model inoculated with enterotoxigenic E. coli. Digestive physiology in pigs (DPP) 2022, Rotterdam, Pays bas.

Devailly G., Fève K., Saci S., Sarry J., Vallière S., Bouchez O., Ravon L., Billon Y., Beaumont M., Gilbert H. Transcriptomic and DNA methylation response to feed intake in the duodenum in high- and low- feed efficiency pig lines. Digestive physiology in pigs (DPP) 2022, Rotterdam, Pays bas.

2021

Mussard E., Lencina C., Gallo L., Barilly C., Poli M., Albin M., Cauquil L., Knudsen C., Achard C., Devailly G., Soler L., Combes S., Beaumont M. Development of an intestinal organoid model to study host-microbiota interactions in piglets. 12th International Symposium on Gut Microbiology, 2021, virtuel.

2019

Beaumont M., Paës C., Cauquil L., Aymard P., Barilly C., Bouchez O., Canlet C., Combes S. Early life solid food ingestion remodels the gut microbiota composition and increases the production of protective bacterial metabolites. *Digestive Disease Week*, 2019, San Diego, USA.

8. PARCOURS PROFESSIONNEL

Lors de ma formation d'ingénieur agronome, j'ai rapidement orienté mon projet professionnel vers le secteur de la recherche en biologie animale appliquée aux domaines de la nutrition humaine et de l'élevage. Ainsi, j'ai effectué deux stages en laboratoire dans le cadre d'une année de césure. Dans un premier temps, j'ai travaillé au Canada dans l'équipe de Pierre Lacasse, spécialisé dans la biologie de la lactation. J'ai participé à des expérimentations chez la vache laitière visant à identifier des stratégies nutritionnelles ou pharmacologiques de contrôle de la sécrétion de prolactine au moment du tarissement, une période critique pour la santé de la glande mammaire. La seconde partie de mon année de césure a été consacrée à un stage dans le laboratoire INRAE « Physiologie de la nutrition et du comportement alimentaire » dirigé alors par Daniel Tomé. Encadré par François Blachier, j'ai travaillé sur l'évaluation des effets d'une supplémentation en acides aminés sur la cicatrisation de la muqueuse du côlon après une colite chimio-induite chez le rat (Liu et al., 2013). Cette seconde expérience a conforté mon intérêt pour la physiologie digestive en lien avec la nutrition.

J'ai également eu l'opportunité de réaliser un projet d'ingénieur encadré par Muriel Thomas dans l'équipe « Interactions des bactéries commensales et probiotiques avec l'hôte » de l'unité INRAE MICALIS. Nous avons travaillé à la description des démarches réglementaires requises pour commercialiser de nouvelles bactéries probiotiques tout en analysant la pertinence scientifique des critères pris en compte (Miquel et al., 2015). Souhaitant approfondir mes compétences en physiologie digestive lors de mon stage de fin d'étude, j'ai contacté Nadine Cerf-Bensussan qui a accepté de m'accueillir dans son laboratoire INSERM, spécialisé dans l'étude de l'immunité intestinale et du dialogue avec le microbiote. Nous avons travaillé sur la caractérisation *in vitro* d'une voie de signalisation induite par les immunoglobulines A sécrétées dans les entérocytes lors de la maladie cœliaque (intolérance au gluten).

François Blachier m'a ensuite proposé de revenir dans son équipe pour entreprendre un doctorat à l'interface entre la nutrition protéique, le microbiote intestinal et la physiologie digestive. Nous avons mis en place une étude clinique pour étudier les effets de la quantité et de la source des protéines alimentaires sur le microbiote et sur la muqueuse du gros intestin. En parallèle, nous avons mené des expérimentations (*in vitro* et chez le rat) pour étudier les effets sur les cellules épithéliales de métabolites produits par le microbiote à partir d'acides aminés. Ces expérimentations étaient financées par le programme FP7 de la commission européenne « My New Gut » dont l'objectif général était d'étudier les liens entre alimentation, microbiote et santé. Dans ce cadre, j'ai eu l'opportunité de rencontrer Nathalie Delzenne, directrice du laboratoire « Métabolisme et nutrition » de l'université catholique de Louvain à Bruxelles qui m'a proposé de rejoindre son équipe. Lors de cette expérience postdoctorale, j'ai pu proposer de poursuivre mes travaux sur les métabolites bactériens dérivés des acides aminés dans le contexte de l'étude de la communication intestin-foie chez la souris pour des applications envisagées dans le cadre des maladies métaboliques humaines.

Quelques mois après mon arrivée en Belgique, j'ai décidé de postuler à un concours de chargé de recherche INRAE pour lequel deux postes étaient proposés à Toulouse pour étudier l'interaction entre le microbiote et la barrière intestinale dans le contexte de la toxicologie alimentaire ou de la santé vétérinaire. J'ai été recruté dans le laboratoire Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage (GenPhySE) dirigé à mon arrivée par Xavier Fernandez et où j'ai intégré l'équipe « Nutrition et Ecosystèmes Digestif », animée par Sylvie Combes qui a accompagné ma prise de poste. L'objectif de mon recrutement était de mettre en place dans l'équipe un nouvel axe de recherche visant à étudier la modulation de la fonction de barrière de l'intestin par les métabolites produits par le microbiote, dans le contexte de la préservation de la santé des animaux d'élevage sans utiliser d'antibiotiques. La continuité thématique avec mes travaux antérieurs m'a permis d'appliquer mes compétences pour étudier l'activité métabolique du microbiote intestinal et les conséquences pour l'intestin chez de nouvelles espèces (lapin et porc). J'ai été particulièrement attiré par un des axes de recherche de l'équipe centré sur la mise en place du microbiote au début de la vie (de la naissance au sevrage) et j'ai décidé de focaliser mes recherches sur le rôle des métabolites bactériens dans le développement de l'épithélium intestinal à cette période critique pour la construction de la santé digestive des animaux. Après avoir mis en place au

laboratoire l'utilisation de modèles conventionnels d'étude *in vitro* de l'épithélium intestinal (lignées cellulaires), j'ai consacré une part importante de mon activité au développement et à la caractérisation de modèles d'organoïdes intestinaux de lapin et de porc pour modéliser plus fidèlement l'épithélium intestinal *in vitro*. Ces modèles d'organoïdes intestinaux me permettent actuellement d'étudier les effets des métabolites du microbiote tout en réduisant le recours à l'expérimentation animale.

Dans le futur, je souhaite poursuivre mes travaux sur les effets de métabolites produits par le microbiote au début de la vie sur l'épithélium intestinal avec pour objectifs i) d'approfondir la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents et ii) de développer des approches nutritionnelles ciblant les métabolites bactériens pour renforcer la santé intestinale. Pour cela, je souhaite m'appuyer en particulier sur les nouvelles technologies de biologie moléculaire à l'échelle de la cellule unique ainsi que sur les modèles d'intestins sur puce existant chez l'homme mais encore très peu développés chez les animaux d'élevage.

La première partie de ce mémoire est consacrée au bilan de mes activités de recherche. La seconde partie du mémoire est consacrée à la présentation du projet de recherche que je souhaite mener lors des prochaines années.

9. BILAN : ACTIVITES DE RECHERCHE MENEES DEPUIS LE DOCTORAT (2013 – 2023)

Depuis ma thèse, l'ensemble de mes activités de recherche a porté sur l'influence de la nutrition sur l'activité métabolique du microbiote intestinal et sur les conséquences pour le fonctionnement de l'appareil digestif. La première partie de ce bilan est consacrée aux résultats que j'ai obtenus concernant la modulation nutritionnelle de la production par le microbiote intestinal de métabolites issus des acides aminés et leurs effets sur les cellules de l'hôte. La seconde partie du bilan est centrée sur les travaux que j'ai mené sur l'activité métabolique du microbiote intestinal lors de la transition alimentaire du sevrage en lien avec le développement de la barrière épithéliale et avec la santé digestive. La troisième partie de ce bilan décrit mes activités consacrées au développement et à la caractérisation de modèles d'organoïdes d'intestin de lapin et de porc pour étudier les interactions entre le microbiote et l'épithélium intestinal.

9.1 Production par le microbiote intestinal de métabolites dérivés des acides aminés et conséquences pour les cellules de l'hôte

Les principaux substrats parvenant dans le gros intestin et étant dégradés par le microbiote intestinal sont les glucides non digestibles (Flint et al., 2012). Le catabolisme bactérien des glucides non digestibles est relativement bien connu et mène à la production des acides gras à chaînes courtes (acétate, propionate et butyrate) dont les effets protecteurs pour la santé de l'hôte ont fait l'objet de nombreuses publications (Flint et al., 2012). En comparaison, la dégradation des protéines et des acides aminés par le microbiote est moins bien caractérisée alors qu'une quantité significative de protéines est disponible pour les bactéries intestinales (6-18 g/jour chez l'homme) (Blachier et al., 2007). Au cours de ma thèse, j'ai participé à la **rédaction d'un article de synthèse sur le métabolisme des protéines alimentaires par le microbiote intestinal ainsi que sur les conséquences pour la santé** (Portune et al., 2016)¹. Dans cette revue de la littérature, nous avons présenté la grande diversité des métabolites produits par le microbiote intestinal à partir des acides aminés (neurotransmetteurs, acides gras à chaînes courtes ou ramifiées, composés aromatiques et soufrés, amines et polyamines, ammonium) et décrit leurs principaux effets connus sur les cellules de l'hôte. Nous avons également proposé que les effets des régimes riches en protéines sur la satiété et la physio(patho)logie digestive et rénale pourraient s'expliquer par une augmentation de la production de ces métabolites issus de la dégradation des acides aminés par le microbiote (Figure 1). Ce travail de synthèse a révélé le manque de connaissance i) sur les

¹ Article rédigé en collaboration avec le laboratoire de Yolanda Sanz (CSIC, Valence, Espagne)

déterminants nutritionnels de la production de métabolites bactériens dérivés des acides aminés et ii) concernant leurs effets sur les cellules de l'hôte. Ce chapitre présente dans une première partie mes travaux sur la modulation de l'activité métabolique du microbiote par l'apport alimentaire en protéines et dans une seconde partie les données que j'ai obtenues concernant les effets de métabolites bactériens dérivés des acides aminés sur les cellules épithéliales intestinales et hépatiques.

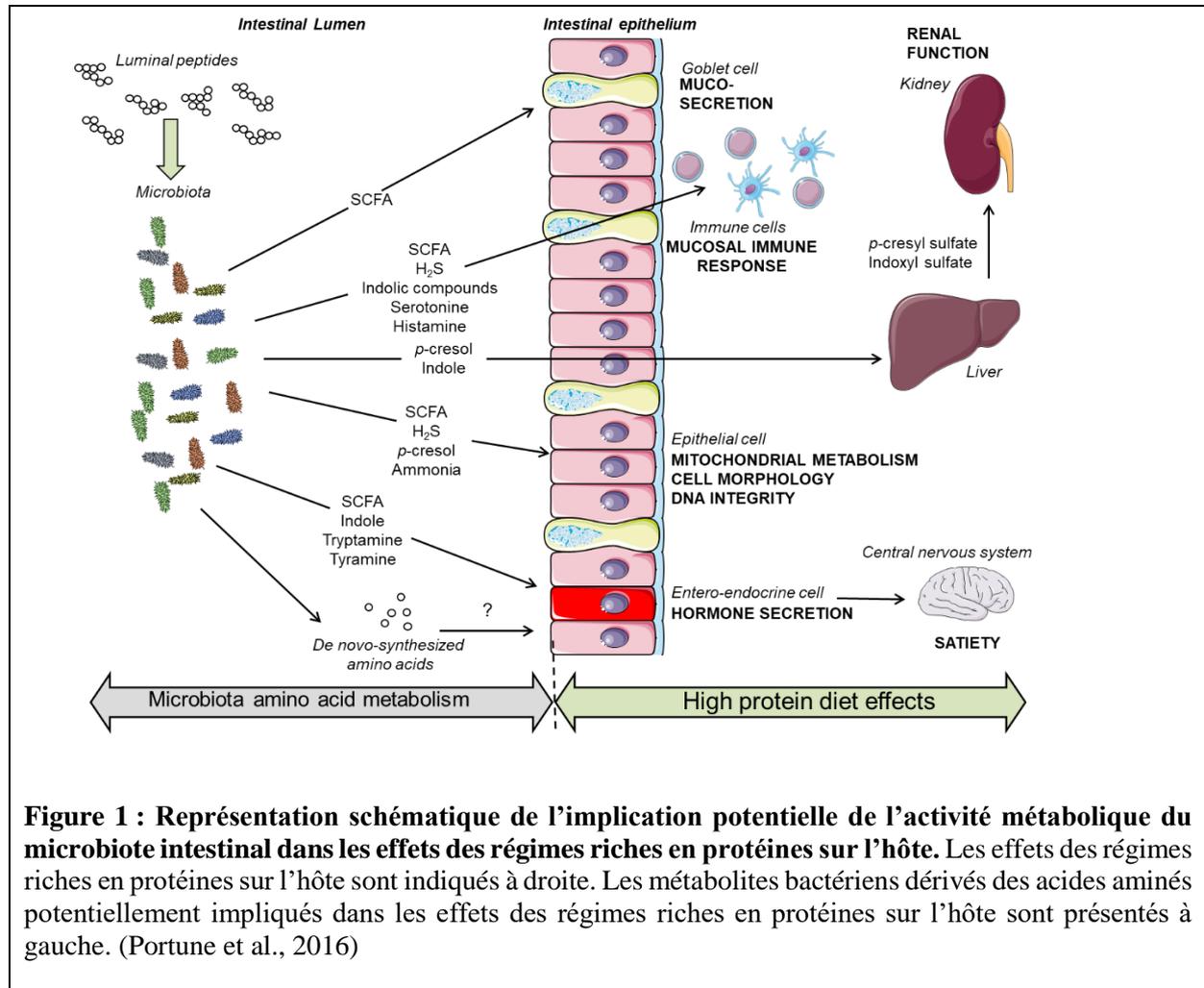


Figure 1 : Représentation schématique de l'implication potentielle de l'activité métabolique du microbiote intestinal dans les effets des régimes riches en protéines sur l'hôte. Les effets des régimes riches en protéines sur l'hôte sont indiqués à droite. Les métabolites bactériens dérivés des acides aminés potentiellement impliqués dans les effets des régimes riches en protéines sur l'hôte sont présentés à gauche. (Portune et al., 2016)

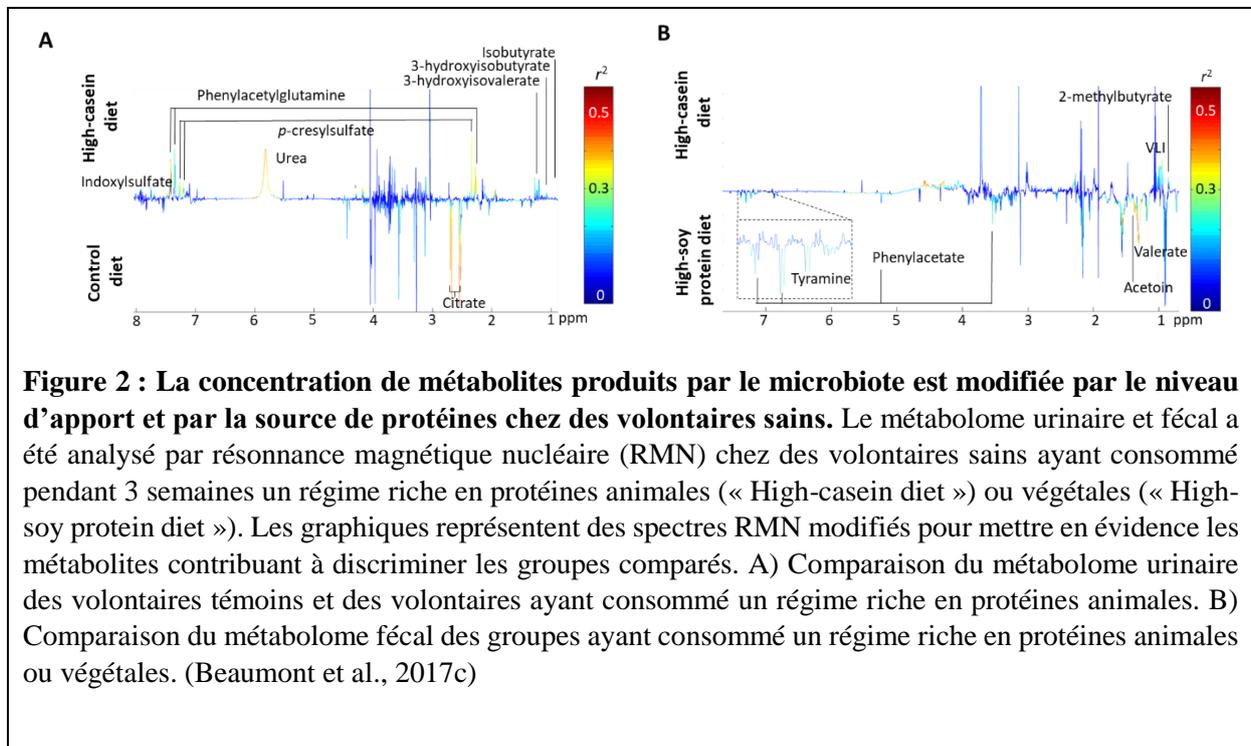
9.1.1 Modulation de l'activité métabolique du microbiote intestinal par l'apport alimentaire en protéines et conséquences pour la santé digestive

Bien que la digestion des protéines soit très efficace, une fraction (<10%) des protéines alimentaires parviennent non digérées au niveau du gros intestin où le microbiote les utilise comme substrats (Davila et al., 2013). Cette quantité de protéines disponibles pour les bactéries intestinales est proportionnelle au niveau d'apport en protéines alimentaires. Par ailleurs, la source de protéines (animale ou végétale) ainsi que la structure des aliments peuvent influencer la digestibilité des protéines (Day et al., 2022). **Lors de ma thèse, nous avons fait l'hypothèse qu'une modulation quantitative et/ou qualitative de l'apport en protéines pourrait moduler la quantité de protéines disponibles pour le microbiote et ainsi influencer sa production de métabolites et, en conséquence, la santé digestive.**

Une étude clinique ² nous a permis de montrer que la consommation d'un régime riche en protéines pendant 3 semaines (30% de l'énergie apportée par les protéines contre 15% dans le groupe témoin) module l'activité métabolique du microbiote en réduisant la production de butyrate et en augmentant la

² Etude clinique menée en collaboration avec le service de gastroentérologie de l'hôpital Avicenne de Bobigny

production de métabolites dérivés des acides aminés (ex : 2-méthylbutyrate, indole, phénylacétate, *p*-cresol)³ (Beaumont et al., 2017c) (Figure 2A). De plus, cette étude nous a permis de montrer que la source de protéines (protéines de lait ou de soja) consommées lors des régimes riches en protéines influence l'activité métabolique du microbiote (ex : plus de phénylacétate produit lors d'une supplémentation en protéines de soja) (Figure 2B), probablement en lien avec les différences de digestibilité et de composition en acides aminés liée à l'origine animale ou végétale des protéines.



L'augmentation de l'exposition de la muqueuse intestinale aux métabolites dérivés des acides aminés lors la consommation de régimes riches en protéines pourrait avoir des conséquences délétères puisque nous avons par exemple montré⁴ que le *p*-cresol en concentration élevée est génotoxique pour l'épithélium intestinal *in vitro* (Andriamihaja et al., 2015) (Figure 3). La comparaison du transcriptome de biopsies rectales obtenues avant et après la période d'intervention nutritionnelle nous a permis de mettre en évidence que les modifications de concentrations de métabolites bactériens induites par la consommation d'un régime riche en protéines étaient associées à des modifications d'expression de gènes impliqués dans des processus cellulaires essentiels à l'homéostasie de la muqueuse (apoptose, cycle cellulaire, interactions avec la matrice extracellulaire, etc.). Néanmoins, ces modifications d'expressions de gènes n'était pas accompagnées d'altérations de la morphologie de la muqueuse ou de l'immunité intestinale (sécrétion d'immunoglobulines A, expression de cytokines). Une étude complémentaire chez le rat nous a apporté des résultats cohérents avec l'étude clinique : la consommation d'un régime riche en protéines a modifié le transcriptome des cellules épithéliales du côlon (surexpression de gènes de mucines, de défensines et d'enzymes de détoxification) mais n'a pas eu d'effets délétères apparents sur la muqueuse (intégrité de l'ADN, inflammation, renouvellement de l'épithélium, perméabilité) (Beaumont et al., 2017a) (Figure 4). Nous avons alors proposé que les modifications transcriptomiques induite par la consommation de régimes riches en protéines chez l'homme et le rat pourrait refléter une réponse adaptative permettant le maintien de l'intégrité intestinale malgré des modulations potentiellement défavorables de la production de métabolites par le microbiote.

³ Analyses métabolomiques réalisées lors d'un séjour dans le laboratoire de Sandrine Claus (Reading, Royaume-Uni)

⁴ Expériences de génotoxicités réalisées lors d'un séjour dans le laboratoire de Marc Audebert (Toxalim, Toulouse)

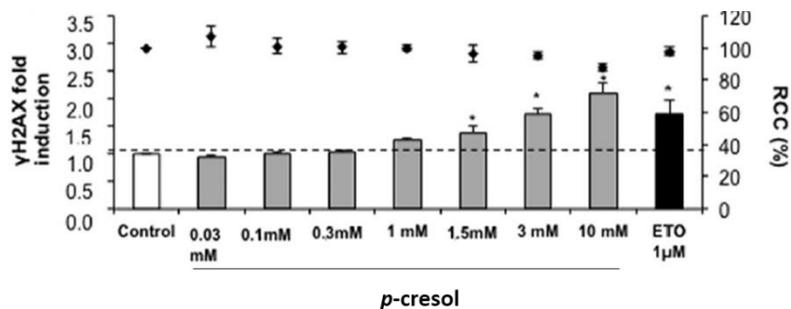


Figure 3 : Le métabolite bactérien *p*-cresol induit des dommages à l'ADN dans les cellules épithéliales intestinales *in vitro*. L'abondance de γ H2AX (marqueur de cassures double brin de l'ADN) a été quantifié par In-Cell-Western dans des cellules épithéliales intestinales HT-29 traitées pendant 24h avec du *p*-cresol ou avec de l'étoposide (ETO, témoin positif de génotoxicité), représenté par les barres. RCC : relative cell count (reflète la viabilité cellulaire), représenté par les points. (Andriamihaja et al., 2015)

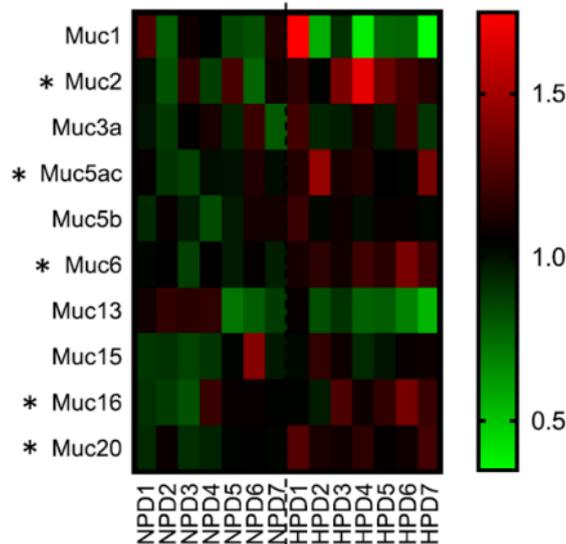


Figure 4 : La consommation d'un régime riche en protéines augmente l'expression des mucines dans l'épithélium du côlon chez le rat. L'expression de gènes de mucines a été analysée dans des cellules épithéliales isolées du côlon de rats consommant un régime témoin normoprotéique (NPD, « normal protein diet ») ou riche en protéines (HPD, « high protein diet »). (Beaumont et al., 2017a)

Par ailleurs, j'ai participé à un projet collaboratif ⁵ lors duquel nous avons montré chez le rat que la structure d'un aliment modèle (sous forme d'émulsion fine ou grossière) influence la digestibilité des

⁵ Projet ALIAS du Labex Université Paris Saclay réunissant les unités PNCA, MICALIS et GENIAL

protéines et l'expression de gènes de transporteurs d'acides aminés (Beaumont et al., 2017b; Oberli et al., 2018). Ces résultats suggérant une modification de la disponibilité des acides aminés dans l'intestin en fonction de la structure des aliments étaient associés à une modulation de la composition du microbiote et de la production d'isovalérate (métabolite bactérien issu du catabolisme de la leucine) ainsi que de l'expression d'entérohormones. Nous avons conclu que la structure des aliments pourrait donc influencer le fonctionnement de l'épithélium intestinal via une modification de la digestibilité des protéines et/ou de leur utilisation par le microbiote.

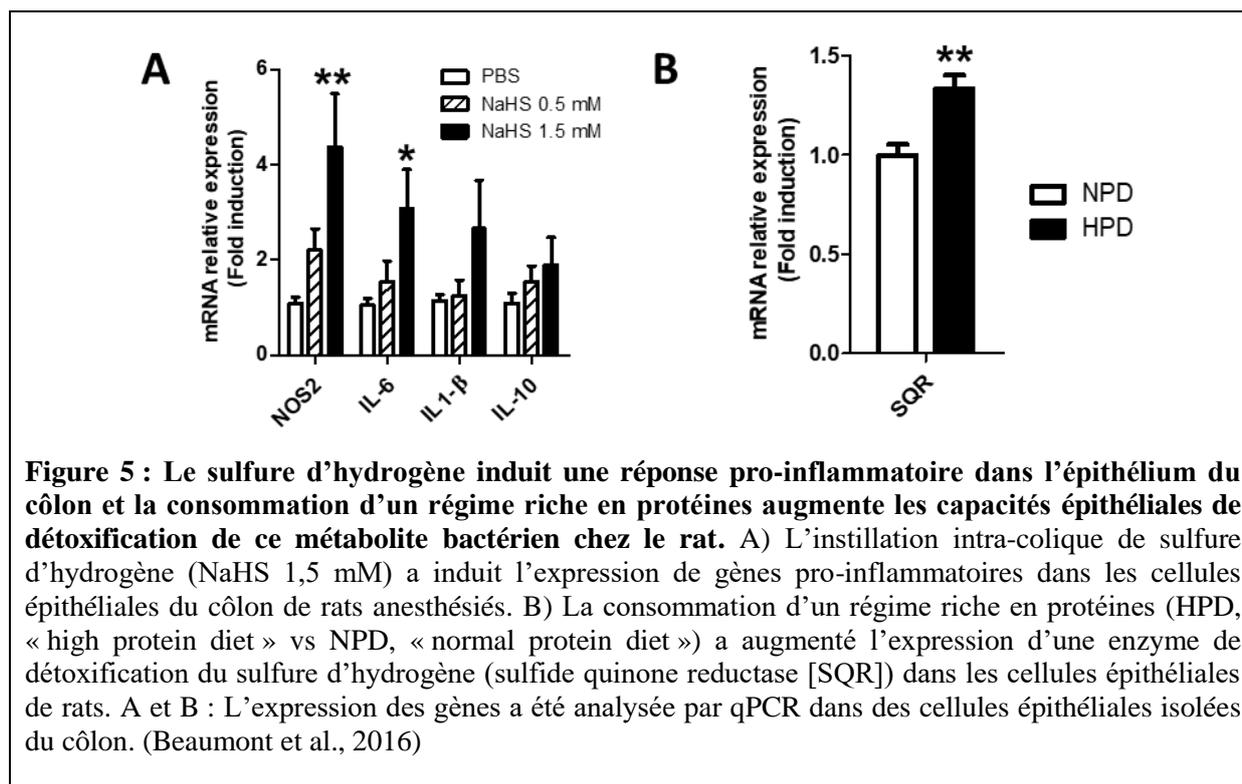
Globalement, ces travaux menés lors de ma thèse ont permis d'obtenir de nouvelles données montrant que le niveau d'apport en protéines, l'origine animale ou végétale des protéines et la structure de l'aliment apportant les protéines influencent la production par le microbiote intestinal de métabolites dérivés des acides aminés. Ces effets sont associés à des modifications d'expression de gènes impliqués dans diverses fonctions de l'épithélium intestinal (rôle de barrière, transport de nutriments, production d'hormones). Cependant, ces travaux n'ont pas mis en évidence le rôle causal des métabolites produits par le microbiote à partir des acides aminés dans les effets observés au niveau de la muqueuse intestinale. La partie suivante présente les résultats que j'ai obtenus quant aux effets directs des métabolites dérivés d'acides aminés sur les cellules de l'hôte.

9.1.2 Effets de métabolites produits par le microbiote à partir d'acides aminés sur les cellules de l'épithélium intestinal et du foie

La diversité structurale des acides aminés entraîne la production de très nombreux métabolites lors de leur catabolisme par les bactéries du microbiote intestinal (Portune et al., 2016). Je me suis intéressé plus particulièrement à deux d'entre eux : le sulfure d'hydrogène dérivé des acides aminés soufrés et l'indole dérivé du tryptophane. En effet, mon laboratoire de thèse travaillait de longue date sur le sulfure d'hydrogène et avait montré que les cellules épithéliales intestinales étaient capables de l'utiliser comme substrat énergétique (Gubern et al., 2007). En ce qui concerne l'indole, il s'agissant de l'un des premiers métabolites bactériens dont les effets protecteurs pour la fonction de barrière de l'intestin avaient été montrés (Bansal et al., 2010).

9.1.2.1 Effets du sulfure d'hydrogène sur l'épithélium intestinal

Le sulfure d'hydrogène (H₂S) est un gaz dont les effets sur l'épithélium intestinal sont très controversés dans la mesure où des effets protecteurs sont décrits à faible concentration (renforcement de la couche de mucus, réduction de l'inflammation, utilisation comme source d'énergie, inhibition de la croissance tumorale) alors qu'à l'inverse des effets toxiques sont observés aux concentrations élevées (déstabilisation de la couche de mucus, effets pro-inflammatoires, inhibition du métabolisme mitochondrial, développement tumoral) (Blachier et al., 2010). **Un des objectifs de ma thèse était de mieux caractériser quelles étaient les conséquences pour l'épithélium du côlon d'une exposition élevée au sulfure d'hydrogène pouvant être atteinte lors de la consommation de régimes riches en protéines.** La plupart des données disponibles dans la littérature ayant été obtenues *in vitro*, nous avons utilisé un modèle de rat anesthésié permettant d'instiller dans le côlon une solution de donneur de sulfure d'hydrogène (NaHS, hydrogénosulfure de sodium). Nous avons observé que l'exposition à une concentration élevée de sulfure d'hydrogène (1,5 mM) pendant 2h augmente l'expression de gènes liés à l'inflammation (nitric oxide synthase 2 [NOS2], interleukin-6 [IL6]) mais n'a pas d'effet génotoxique (Beaumont et al., 2016) (Figure 5A). Par ailleurs, nous avons montré chez le rat que les effets de l'augmentation de la production de sulfure d'hydrogène par le microbiote lors de la consommation d'un régime riche en protéines pouvaient être potentiellement atténués par deux mécanismes : i) une augmentation de la quantité de contenu digestif limitant l'augmentation de la concentration de sulfure d'hydrogène et ii) une augmentation dans l'épithélium intestinal de l'expression du gène codant pour une enzyme de détoxification du sulfure d'hydrogène (sulfide quinone reductase [SQR]) (Beaumont et al., 2016) (Figure 5B).



Suite à ce travail, nous avons rédigé un article de revue centré sur les liens entre le sulfure d'hydrogène produit à partir de la cystéine et la santé digestive (Blachier et al., 2019). Nous avons conclu que la production endogène de faibles concentrations de sulfure d'hydrogène par les cellules épithéliales est probablement bénéfique pour la fonction de barrière tandis qu'une concentration excessive de sulfure d'hydrogène par les bactéries du microbiote intestinal pourrait être toxique. Plusieurs stratégies pourraient être proposées pour limiter les effets toxiques du sulfure d'hydrogène produit par le microbiote : i) réduire les substrats soufrés disponibles dans la lumière intestinale (ex : en limitant l'apport en protéines), ii) réduire l'abondance des bactéries productrices de sulfure d'hydrogène (ex : en modifiant la composition du microbiote par une approche prébiotique) ou iii) utiliser des composés permettant de piéger le sulfure d'hydrogène pour limiter l'exposition de l'épithélium intestinal. Cette troisième stratégie a été appliquée dans une étude à laquelle j'ai participé et où l'utilisation de polyphénols (proanthocyanidines) a permis de réduire les effets toxiques du sulfure d'hydrogène sur la respiration mitochondriale des cellules épithéliales, probablement en raison de sa liaison avec les polyphénols (Andriamihaja et al., 2018).

Plus récemment, j'ai participé à une étude⁶ montrant que la dysfonction du métabolisme mitochondrial des cellules épithéliales du côlon observée dans un modèle de souris obèses est associée à une production accrue de sulfure d'hydrogène par le microbiote intestinal (Guerbette et al., 2023). Dans ce travail, les résultats que j'ai contribué à obtenir ont montré que la consommation d'un régime obésogène augmente l'abondance prédite de la voie de la réduction des sulfates par le microbiote, en lien avec l'augmentation de l'abondance des *Desulfovibrionaceae*, une famille bactérienne capable de produire du sulfure d'hydrogène à partir de multiples précurseurs (sulfates, cystéine, taurine). Ces observations étaient associées à une augmentation de la concentration dans le côlon d'acides biliaires connus pour représenter une source importante de taurine pouvant être également être dégradée en sulfure d'hydrogène par *Bilophila wadsworthia* dont l'abondance était augmentée chez les souris obèses.

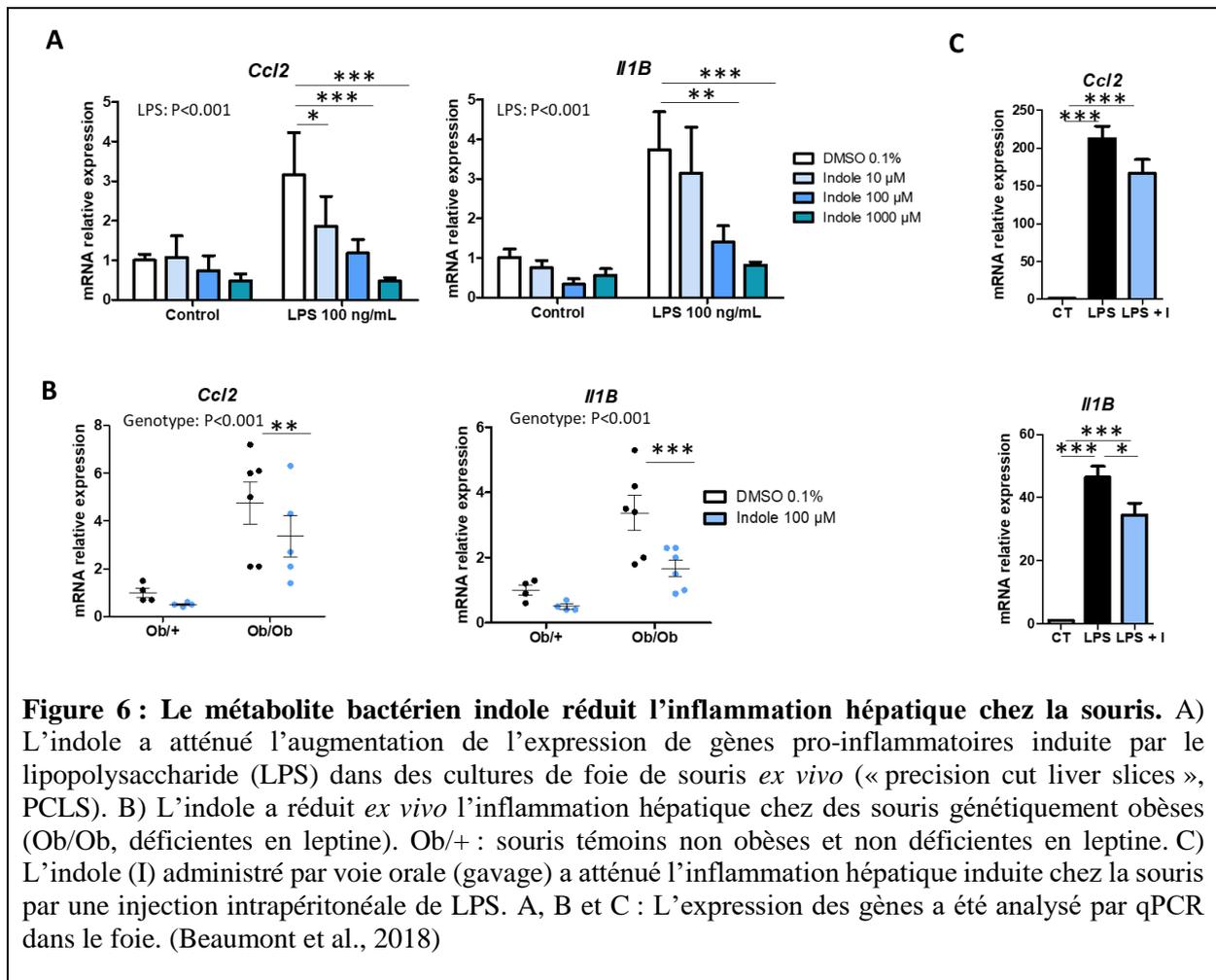
⁶ Collaboration avec Gaëlle Boudry et Annaïg Lan (UMR NUMECAN, INRAE, INSERM, Rennes)

En conclusion, nos résultats ont confirmé qu'une production excessive de sulfure d'hydrogène par le microbiote intestinal semble délétère pour le fonctionnement de l'épithélium intestinal. Cependant, les techniques utilisées pour quantifier le sulfure d'hydrogène présentent des difficultés liées à sa forme gazeuse et manquent parfois de spécificité (ex : dosage au bleu de méthylène détectant d'autres composés soufrés) ce qui a conduit à une surestimation de sa concentration luminale dans la littérature (Yao et al., 2018). Cette limite est majeure dans la mesure où des effets protecteurs du sulfure d'hydrogène sont observés à faible concentration. Ce champ de recherche bénéficierait donc fortement du développement de méthodes spécifiques, simples à mettre en œuvre et peu coûteuses pour doser le sulfure d'hydrogène produit par le microbiote intestinal et ainsi tester les effets de ce métabolite sur l'épithélium à des concentrations pertinentes.

De manière plus globale, peu d'informations sont généralement disponibles pour estimer l'exposition réelle des cellules de l'hôte aux métabolites bactériens. En effet, les concentrations des métabolites mesurées dans la lumière intestinale résultent de l'équilibre entre leur production par les bactéries et leur absorption par l'épithélium. Des approches de quantifications de flux de métabolites en utilisant des traceurs pourraient permettre de mieux caractériser cette exposition des cellules aux métabolites bactériens. De plus, il existe *in vivo* des gradients de concentrations de métabolites bactériens, comme montré pour le butyrate dont la concentration décroît du sommet vers la base des cryptes (Kaiko et al., 2016), mais cet aspect a rarement été pris en compte. Le développement récent de systèmes microphysiologiques d'intestins sur puce permettant de modéliser l'écoulement dynamique de fluides et l'architecture de l'épithélium (Ashammakhi et al., 2020) pourrait permettre d'étudier les effets des métabolites bactériens sur l'épithélium dans des conditions nettement plus physiologiques (cf. partie projet). Par exemple, une étude récente a utilisé un modèle d'intestin sur puce colonisé avec des souches de bactéries génétiquement modifiées afin de contrôler leur production de sulfure d'hydrogène *in vitro*, de manière dynamique et à proximité des cellules épithéliales (Hayes et al., 2023).

9.1.2.2 Effets de l'indole sur l'inflammation hépatique

Les métabolites produits par le microbiote intestinal peuvent être absorbés par les cellules épithéliales intestinales puis transportés via la circulation sanguine et constituent ainsi un des supports moléculaires de l'action des bactéries sur les organes situés à distance de l'intestin. Le foie est le premier organe exposé aux métabolites produits par le microbiote intestinal via la veine porte (Hsu and Schnabl, 2023). **Lors de mon postdoctorat, je me suis intéressé aux effets hépatiques de métabolites produits par le microbiote intestinal à partir des acides aminés.** En effet, il était connu que le foie est exposé à des métabolites dérivés des acides aminés tels que le phénylacétate, le benzoate, le p-cresol et l'indole (Wikoff et al., 2009) mais leurs effets sur les cellules hépatiques était peu décrit. L'utilisation d'un modèle *ex vivo* d'explants de foie de souris (« precision cut liver slices » [PCLS]) nous a permis de montrer que l'indole réduit l'inflammation hépatique induite par le lipopolysaccharide (LPS) ou par une obésité génétique (souris Ob/Ob) (Beaumont et al., 2018) (Figure 6A et B). L'utilisation d'un modèle de souris déplétées en macrophages hépatiques (cellules de Kupffer) nous a permis de montrer que les effets anti-inflammatoires de l'indole dépendaient en partie de ces cellules mais que d'autres types cellulaires étaient également impliqués. Nous avons également confirmé qu'une administration orale d'indole réduit aussi l'inflammation hépatique dans un modèle *in vivo* d'endotoxémie aiguë (Figure 6C). Un autre laboratoire a ensuite confirmé ces effets anti-inflammatoires de l'indole au niveau du foie dans un modèle de stéatose hépatique chez la souris (Ma et al., 2020). La poursuite de mon travail de postdoctorat a également confirmé cet effet protecteur de l'indole dans le cadre d'une stéatose hépatique chez la souris (Knudsen et al., 2021). Des données plus récentes ont aussi montré que d'autres métabolites bactériens dérivés du tryptophane (indole-3-acétate, indole-3-propionate) exercent des effets protecteurs sur le foie (Teunis et al., 2022).



Ces travaux ont permis de mettre en évidence le rôle protecteur de l'indole dans l'axe intestin-foie et ouvrent des perspectives thérapeutiques dans le contexte des maladies hépatiques en mettant en place des stratégies visant à augmenter l'exposition du foie à l'indole via l'administration i) directe d'indole, ii) de bactéries productrices d'indole (approche probiotique), iii) de tryptophane, l'acide aminé précurseur de l'indole (approche prébiotique) ou iv) de bactéries productrices d'indole et de tryptophane (approche symbiotique) (Hendrikx and Schnabl, 2019). Bien que prometteuses, ces stratégies n'ont pas encore été mises en place aujourd'hui. Récemment, j'ai participé à la **rédaction d'un article de revue⁷ dans lequel nous avons proposé le concept d'« aminobiotiques » correspondant à l'utilisation d'acides aminés pour leur action prébiotique**, c'est-à-dire de substrats dont l'utilisation par le microbiote entraîne un bénéfice pour la santé de l'hôte (Beaumont et al., 2022b). Ce concept pourrait par exemple être appliqué à une supplémentation en tryptophane ciblant le microbiote pour produire des composés indoliques protecteurs. La principale difficulté pour mettre en œuvre cette approche est le site d'absorption proximale dans l'intestin (jéjunum) des acides aminés apportés sous forme libre. Je participe actuellement à un projet collaboratif avec une entreprise ⁸ dont le but est d'acheminer des acides aminés jusqu'aux parties distales de l'intestin (où la densité du microbiote et les activités fermentaires sont les plus importantes) pour que les bactéries puissent y produire les métabolites d'intérêt. Pour cela, nous utilisons un système de capsules lipidiques dont la dégradation par les lipases permet de libérer les acides aminés dans une partie plus distale de l'intestin. Ce projet pourra être à l'origine du développement de produits nutritionnels innovant favorisant la production de métabolites bactériens bénéfiques pour la santé. En lien avec cette thématique, j'ai été invité à présenter les interactions entre acides aminés et microbiote lors de la conférence « Amino Acid Academy » (Paris, 2021).

Principaux résultats

- La quantité de protéines ingérées, l'origine animale ou végétale des protéines et la structure des aliments apportant les protéines influencent la production par le microbiote intestinal de métabolites, notamment issus des acides aminés
- La consommation d'un régime riche en protéines modifie l'expression des gènes dans le côlon sans que des effets délétères ne soient observés à court terme
- Une concentration élevée du métabolite bactérien *p*-cresol induit des dommages à l'ADN des cellules épithéliales intestinales *in vitro*
- Une concentration élevée de sulfure d'hydrogène induit une réponse pro-inflammatoire et perturbe le métabolisme mitochondrial dans les cellules épithéliales du côlon
- L'indole est un métabolite bactérien aux propriétés anti-inflammatoires au niveau hépatique

⁷ Collaboration avec l'entreprise METEX (fabricant d'acides aminés) et les universités de Gand (Belgique) et de Queensland (Brisbane, Australie)

⁸ Collaboration avec l'entreprise METEX et les unités PEGASE (Rennes), BIOEPAR (Nantes), BIA (Nantes), PFIE (Tours)

9.2 Modulation de la production de métabolites par le microbiote intestinal lors de la transition alimentaire du sevrage et conséquences pour le développement de l'intestin et la santé digestive

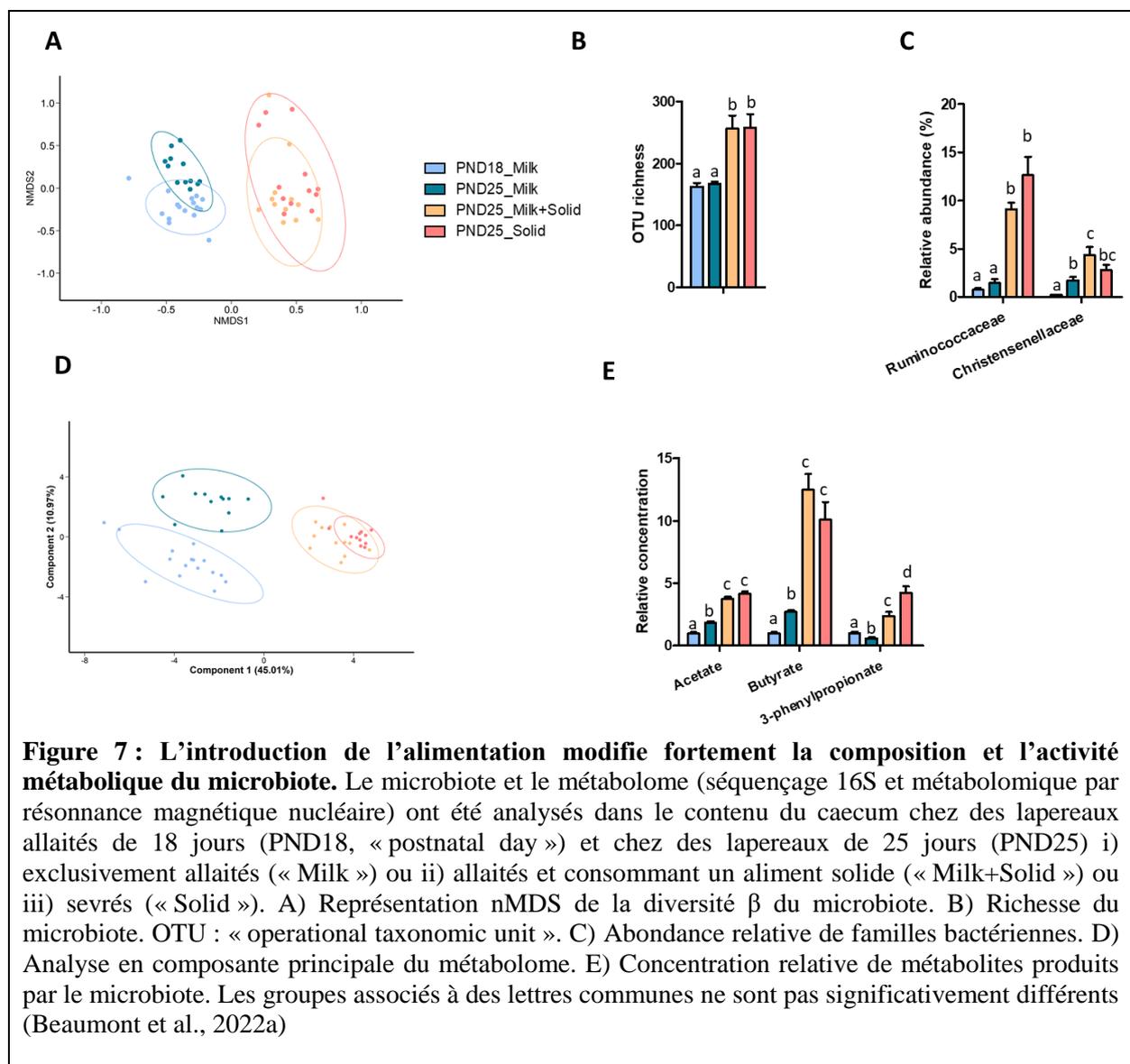
Chez les mammifères, la période de la transition alimentaire du sevrage est une étape clé du développement de l'intestin au cours de laquelle les capacités digestives s'adaptent aux aliments solides (Henning, 1985). Simultanément, la composition du microbiote évolue lors du sevrage en favorisant les espèces les plus adaptées aux nouveaux substrats disponibles. Ces changements microbiens sont impliqués dans le développement de la fonction de barrière de l'intestin, au niveau de l'épithélium intestinal et du système immunitaire associé à la muqueuse (Hooper, 2004). Le bon déroulement de la maturation de l'intestin lors de la période du sevrage a des conséquences durables pour la santé digestive (Al Nabhani and Eberl, 2020), il est donc essentiel de comprendre comment le microbiote influence le développement de la barrière intestinale lors du passage de l'allaitement maternel à l'ingestion des aliments solides. **L'hypothèse centrale de mon travail depuis mon recrutement en tant que chargé de recherche INRAE propose que les métabolites produits par le microbiote intestinal lors de la transition alimentaire du sevrage pourraient contribuer à la maturation de la barrière épithéliale.** Mes travaux à ce sujet reposent sur l'utilisation de deux modèles animaux : le lapin et le porc. Ces deux espèces permettent de répondre à des questions complémentaires en raison de leurs différences de maturité de l'intestin à la naissance (lapin < porc) et de dynamique d'introduction de l'alimentation solide (progressive chez le lapin et abrupte chez le porc en condition d'élevage). De plus, chez ces deux espèces, la période du sevrage est associée à des troubles digestifs nécessitant des traitements antibiotiques en élevage (Paul et al., 2022). Bien qu'en diminution, ces pratiques vétérinaires contribuent à l'émergence d'antibiorésistances menaçant la santé publique, il est donc urgent de trouver des solutions pour préserver la santé digestive des animaux d'élevage sans utiliser d'antibiotiques. Dans ce contexte, **la régulation nutritionnelle de l'activité métabolique du microbiote intestinal lors de la transition alimentaire du sevrage pourrait être une stratégie prometteuse pour optimiser le développement de l'intestin et ainsi programmer la santé digestive.** La première partie de ce chapitre présente les travaux que j'ai mené sur la co-maturation du microbiote et de la barrière épithéliale intestinale chez le lapin. La seconde partie décrit les projets concernant l'activité métabolique du microbiote intestinal des porcelets allaités et sevrés, en lien avec le fonctionnement de l'épithélium intestinal et la susceptibilité aux diarrhées post-sevrage.

9.2.1 Etude de la co-maturation du microbiote intestinal et de la barrière épithéliale chez le lapin lors de l'introduction de l'alimentation solide

Les premiers travaux que j'ai menés suite à mon recrutement en tant que chargé de recherche INRAE ont eu pour but de caractériser la co-maturation du microbiote et de la barrière intestinale chez le lapin lors de la transition alimentaire du sevrage. Ces données n'étaient pas disponibles dans cette espèce pourtant idéale pour étudier l'introduction de l'alimentation solide en raison de la stratégie unique d'allaitement : une fois par jour pendant quelques minutes. Cette particularité permet de dissocier les apports alimentaires de la mère et de ses petits, contrairement aux autres espèces tel que le porc ou la souris. Pour ce projet, je me suis appuyé sur un protocole expérimental en cours à mon arrivée dans l'équipe⁹ et sur un dispositif expérimental que nous avons ensuite mis en place pour contrôler l'ingestion de lait et d'aliments solides par les lapereaux afin d'identifier les effets directement liés à l'introduction de l'alimentation solide et non à l'âge ou à l'arrêt de l'allaitement. Nos résultats montrent que l'introduction de l'alimentation solide par des lapereaux allaités entraîne une forte augmentation de la diversité du microbiote et modifie sa composition en faveur de groupes bactériens spécialisés dans l'utilisation des glucides végétaux complexes tels que *Ruminococcaceae* et *Chistensenellaceae* (Figure 7A-C) (Beaumont et al., 2020, 2022a; Paës et al., 2022). Une approche de métabolomique par résonance

⁹ Projet eFeedIt - Institut Carnot France Futur Elevage, coordonné par Sylvie Combes (GenPhySE, INRAE, Toulouse)

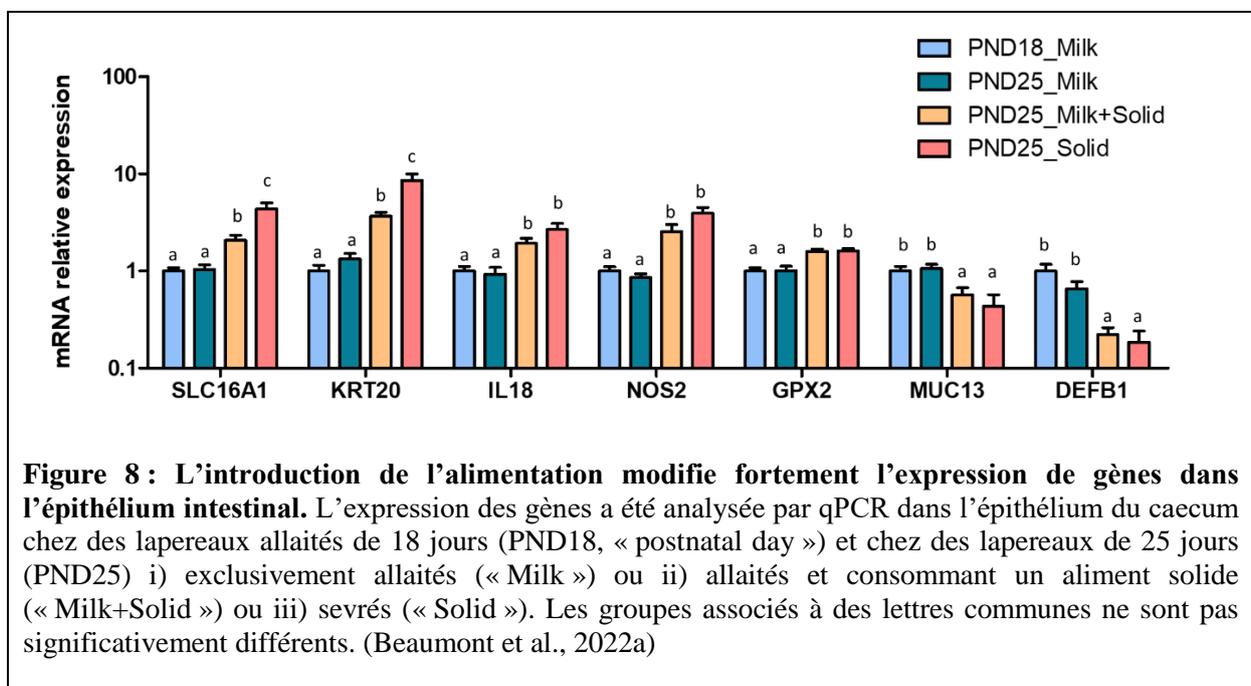
magnétique nucléaire (RMN)¹⁰ nous a permis de montrer que ces changements de composition du microbiote lors de l'introduction de l'alimentation solide sont associés à une modification de son activité métabolique avec notamment une augmentation de la concentration des métabolites issus de la dégradation bactérienne de glucides complexes (acétate, butyrate) ou de polyphénols (3-phénylpropionate) (Figure 7D et E) (Beaumont et al., 2020, 2022a; Paës et al., 2022). Les travaux menés dans le cadre de la thèse de Charlotte Paës (encadrée par Sylvie Combes, UMR GenPhySE) auxquels j'ai contribué ont montré qu'une stimulation précoce de l'ingestion par apport d'un aliment solide sous forme de gel dans le nid pouvait accélérer cette maturation de la composition et de l'activité métabolique du microbiote (Paës et al., 2022). Plus récemment, le travail de stage de Master 2 de Chloé Bredon que j'ai encadré dans le contexte de mon projet ANR JCJC (MetaboWean) a montré qu'une supplémentation en polyphénols dans les premiers aliments solides ingérés influence fortement la composition et l'activité métabolique du microbiote (données non publiées). **L'ensemble de ces résultats suggère qu'il serait possible d'orienter le développement du microbiote et de son activité métabolique au début de la vie en agissant sur la cinétique d'introduction de l'alimentation solide et/ou sur la composition de ces premiers aliments ingérés.**



¹⁰ Collaboration avec Cécile Canlet (plateforme de métabolomique, Axiom-MetaToul/TOXALIM, Toulouse)

Au niveau de l'épithélium intestinal, nous avons constaté que la maturation du microbiote et l'évolution de son activité métabolique lors de l'introduction de l'alimentation solide coïncide avec une diminution de la perméabilité de la muqueuse du caecum ¹¹ et avec une forte modulation de l'expression de gènes impliqués dans le renouvellement et la différenciation de l'épithélium ou codant pour des mucines, des peptides antimicrobiens, des protéines de jonction serrées et des cytokines (Figure 8) (Beaumont et al., 2020, 2022a). Nous avons alors cherché à démontrer le lien de causalité entre cette maturation de la barrière épithéliale observée lors de l'introduction de l'alimentation solide et les métabolites produits par le microbiote. Le traitement de cellules épithéliales cultivées *in vitro* (lignée humaine Caco-2) par le surnageant stérile du contenu caecal de lapereaux allaités et ingérant des aliments solides a entraîné une accélération du développement de la barrière épithéliale (évalué par la mesure de la résistance électrique transépithéliale, TEER) en comparaison du contenu caecal de lapereaux exclusivement allaités (Figure 9) (Beaumont et al., 2020). Le test des effets des métabolites bactériens dont la concentration dans le caecum était modifiée après l'introduction de l'alimentation solide a montré que l'augmentation de la concentration de butyrate joue probablement un rôle important dans le développement de la fonction de barrière de l'épithélium intestinal lors de la transition du sevrage. Des expériences complémentaires menées dans un modèle d'organoïdes de caecum de lapin (décrit ci-dessous) ont également montré que le contenu stérile du caecum obtenu après l'ingestion des aliments solides permettait de reproduire *in vitro* certaines des modifications d'expression de gènes observées *in vivo* lors de l'introduction de l'alimentation solide (Beaumont et al., 2020).

Globalement, nos données indiquent que les métabolites produits par le microbiote pourraient contribuer à la maturation de la barrière épithéliale. J'ai présenté ces résultats lors d'une conférence invitée aux Journées Francophones de Nutrition (JFN, 2020). Il est désormais nécessaire d'identifier quels métabolites bactériens contribuent à la maturation de l'épithélium, au-delà du rôle majeur du butyrate. Nous avons récemment obtenu de nouvelles données de métabolomique par spectrométrie de masse montrant que l'introduction de l'alimentation solide modifie la concentration de centaines de métabolites dans le caecum des lapereaux. Ce jeu de données servira de base pour sélectionner les métabolites bactériens dont les effets sur la fonction de barrière de l'épithélium seront étudiés sur des organoïdes et avec des approches de transcriptomique en cellule unique (cf. partie projet).



¹¹ Mesures *ex vivo* de perméabilité intestinale en chambre de Ussing réalisées en collaboration avec l'équipe de Vassilia Théodorou (Toxalim, INRAE, Toulouse)

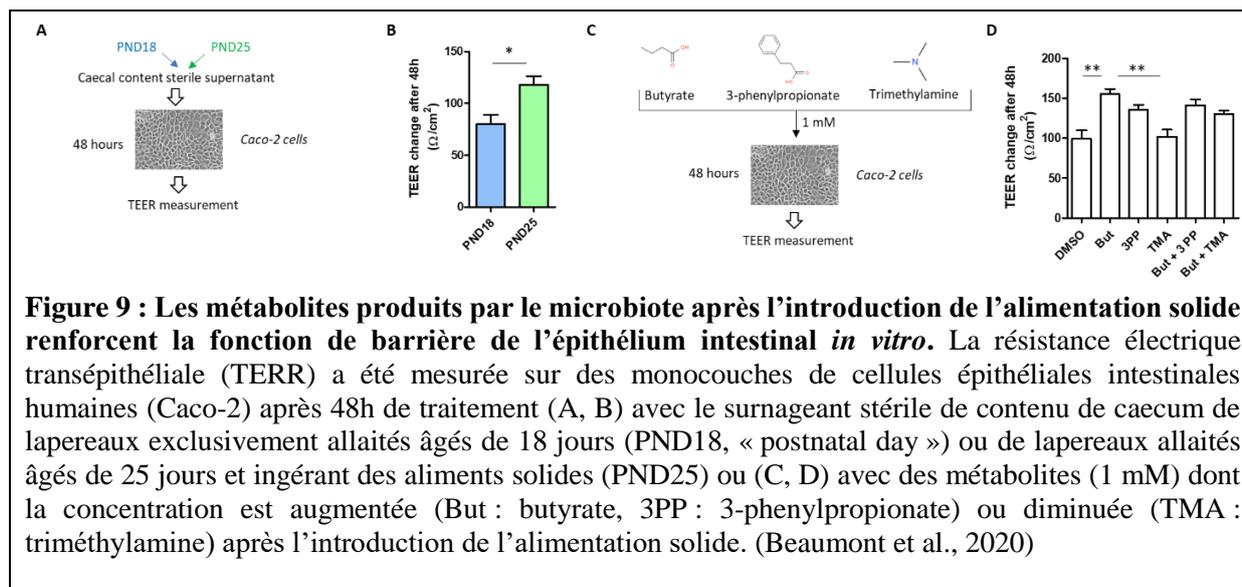


Figure 9 : Les métabolites produits par le microbiote après l'introduction de l'alimentation solide renforcent la fonction de barrière de l'épithélium intestinal *in vitro*. La résistance électrique transépithéliale (TEER) a été mesurée sur des monocouches de cellules épithéliales intestinales humaines (Caco-2) après 48h de traitement (A, B) avec le surnageant stérilisé de contenu de caecum de lapereaux exclusivement allaités âgés de 18 jours (PND18, « postnatal day ») ou de lapereaux allaités âgés de 25 jours et ingérant des aliments solides (PND25) ou (C, D) avec des métabolites (1 mM) dont la concentration est augmentée (But : butyrate, 3PP : 3-phenylpropionate) ou diminuée (TMA : triméthylamine) après l'introduction de l'alimentation solide. (Beaumont et al., 2020)

En lien avec cette thématique, je participe également à un projet de mon équipe ¹² dont le but est de caractériser la maturation du système immunitaire associé à la muqueuse dans le caecum du lapin lors de l'introduction de l'alimentation solide en utilisant une approche de transcriptomique en cellule unique appliqué à des cellules CD45⁺ isolées de la *lamina propria*. Ces résultats permettront de compléter notre caractérisation de la co-maturation du microbiote et de la barrière intestinale, au-delà de sa composante épithéliale. Je suis également impliqué dans un autre projet de mon équipe ¹³ dont le but est d'étudier le rôle des oligosaccharides du lait de lapines dans la mise en place et le développement du microbiote et de la barrière intestinale au début de la vie. Dans ce contexte, je participe aux travaux de thèse de Mathilde Rumeau (co-encadrée par Sylvie Combes et Christelle Knudsen, UMR GenPhySE, INRAE, Toulouse) pour caractériser les métabolites issus de la dégradation d'oligosaccharides de lait de lapines par des bactéries isolées du microbiote de lapereaux. Enfin, dans le cadre d'une étude menée dans mon unité ¹⁴, j'ai co-encadré avec Christelle Knudsen (UMR GenPhySE, INRAE, Toulouse) les travaux de stage de Master 2 de Jennyfer Saucou qui ont contribué à montrer chez le lapin que la sélection génétique pour la résistance aux maladies a peu d'effet sur le microbiote et la barrière intestinale dans le contexte d'un sevrage précoce induisant un challenge pour la santé digestive.

9.2.2 Etude des liens entre l'activité métabolique du microbiote et santé digestive chez les porcelets allaités ou sevrés

Le sevrage est une période critique pour la santé digestive chez le porcelet en élevage (Moeser et al., 2017). Des différences importantes de composition du microbiote intestinal sont décrites entre les porcelets allaités et sevrés, en lien avec les capacités métaboliques des bactéries utilisatrices des substrats dérivés du lait ou des plantes (Frese et al., 2015). Ces modifications de microbiote associées avec le sevrage ont été proposées comme un facteur déterminant des troubles digestifs post-sevrage des porcelets (Nowland et al., 2022). Cependant, lors de mon recrutement à INRAE, peu de données étaient disponibles concernant l'activité métabolique du microbiote du porcelet et nous avons fait l'hypothèse que la production de métabolites bactériens pourrait contribuer à la santé de l'intestin des porcelets au moment du sevrage. A partir d'échantillons de fèces collectés dans le cadre d'un projet en cours dans l'équipe à mon arrivée ¹⁵, j'ai pu montrer par métabolomique RMN que le microbiote des porcelets allaités produit des concentrations élevées de métabolites dérivés des acides aminés (ex : cadavérine,

¹² Projet MAGICS, coordonné par Christelle Knudsen (GenPhySE, INRAE, Toulouse)

¹³ Projet HoloOligo, coordonné par Sylvie Combes (GenPhySE, INRAE, Toulouse)

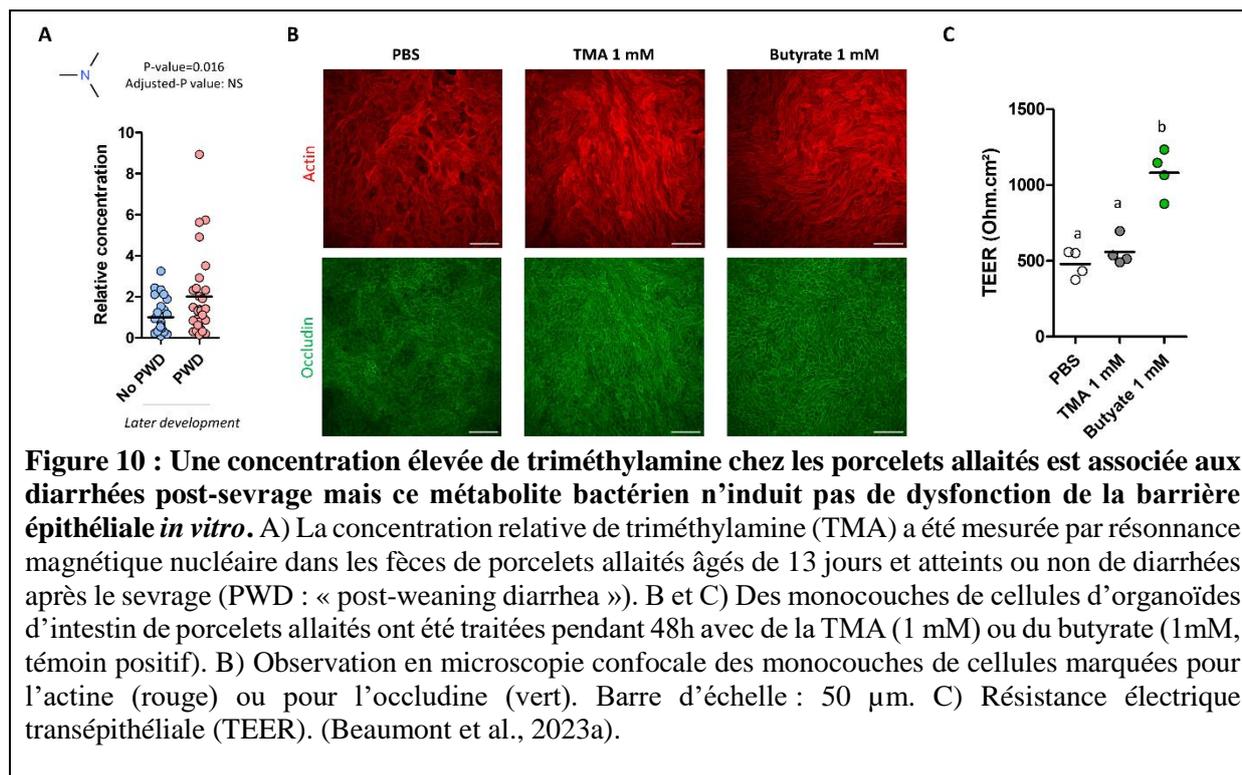
¹⁴ Projet GRAAL, coordonné par Mélanie Gunia (GenPhySE, INRAE, Toulouse)

¹⁵ Contrat de recherche avec l'entreprise Néovia, coordonné par Sylvie Combes (GenPhySE, INRAE, Toulouse)

tyramine, putrescine, 5-aminovalérate) alors que le microbiote des porcelets sevrés produit une quantité importante d'acides gras à courtes chaînes (acétate et propionate) (Beaumont et al., 2021b). Nous avons également montré que ces différences d'activité microbienne étaient associées à une abondance plus élevée des *Lactobacillaceae* et des *Enterobacteriaceae* chez les porcelets allaités alors que le microbiote des porcelets sevrés était plus divers et enrichi en *Ruminococcaceae* et *Oscillospiraceae*. Ces modifications taxonomiques sont cohérentes avec la littérature et avec les capacités fonctionnelles de ces groupes bactériens pour utiliser les substrats dérivés du lait ou des plantes. **Notre caractérisation des métabolites produits par le microbiote des porcelets allaités et sevrés ouvre de nombreuses perspectives d'étude pour la compréhension des effets protecteurs et/ou délétères des métabolites bactériens sur la santé digestive dans la mesure où les effets de la plupart de ces métabolites sur l'épithélium intestinal du porcelet ne sont pas connus.**

Une étude fréquemment citée mais menée sur un faible nombre d'individus a suggéré que le microbiote des porcelets allaités pourrait contribuer à déterminer leur prédisposition aux diarrhées post-sevrage (Dou et al., 2017). Nous avons donc formulé l'hypothèse que les métabolites produits par le microbiote au début de la vie pourraient être impliqués dans la susceptibilité aux diarrhées post-sevrage via leur action sur le développement de la barrière intestinale. Cependant, dans notre jeu de données issu de 116 porcelets provenant de deux élevages, nous n'avons pas observé d'association globale entre l'occurrence des diarrhées post-sevrage et le microbiote ou le métabolome fécal à 13 jours d'âge (période d'allaitement) (Beaumont et al., 2023a). Nous avons néanmoins été intrigués par une association entre une concentration fécale élevée de triméthylamine chez les porcelets allaités et l'occurrence de diarrhées après le sevrage (Figure 10A) (Beaumont et al., 2023a). Nous avons donc fait l'hypothèse que ce métabolite bactérien produit notamment à partir de la choline présente dans le lait maternel (Fennema et al., 2016) pourrait prédisposer les porcelets aux diarrhées post-sevrage via un affaiblissement de la fonction de barrière de l'épithélium intestinal. Les données obtenues dans le cadre d'un nouveau projet ¹⁶ que j'ai coordonné ont montré que la triméthylamine ne perturbe pas la fonction de barrière dans un modèle de monocouches de cellules d'organoïdes d'intestins de porcelets (Figure 10B et C) (Beaumont et al., 2023a). Ces résultats suggèrent donc que la triméthylamine produite par le microbiote au début de la vie ne prédispose pas aux diarrhées post-sevrage via un affaiblissement de la fonction de barrière de l'épithélium. Cependant, d'autres mécanismes pourraient être impliqués tels qu'une modulation des cellules immunitaires de la lamina propria par la triméthylamine. **Nos travaux suggèrent donc que microbiote et son activité métabolique chez les porcelets allaités ne sont pas prédictifs de la susceptibilité aux diarrhées post-sevrage.** Il conviendrait néanmoins d'explorer cette possible relation plus en détail et notamment en lien avec les sous types de diarrhées post-sevrage pouvant être infectieuses, inflammatoires ou osmotiques (Thiagarajah et al., 2015).

¹⁶ Contrat de recherche avec l'entreprise ADM (ex-Néovia)



Le développement de stratégies nutritionnelles de contrôle de l'activité métabolique du microbiote des porcelets pourrait permettre de renforcer leur santé digestive via l'action de métabolites bactériens protecteurs. Dans ce contexte, j'ai coordonné un projet¹⁷ au cours duquel le travail de stage de M2 de Joffrey Viémond-Desplanque a montré que les effets bénéfiques d'une supplémentation en acides aminés (arginine, leucine, valine, isoleucine et cystine) et en polyphénols sur la croissance des porcelets après le sevrage étaient associés à une modulation de la composition du microbiote et à une augmentation dans le caecum de la concentration de certains métabolites bactériens (butyrate, propionate, valérate, putrescine, 3-phenylpropionate) (Beaumont et al., 2021c). Nous pensons que la liaison des acides aminés aux polyphénols pourrait permettre de réduire leur absorption dans l'intestin grêle et ainsi augmenter leur disponibilité pour le microbiote. Par ailleurs, nous avons montré que ce mélange d'acides aminés et de polyphénols avait des effets directs sur l'épithélium dans le modèle des organoïdes d'intestin de porcelets en favorisant la différenciation et en réduisant l'expression de protéines impliquées dans l'immunité épithéliale innée (Beaumont et al., 2021c). Une étude ultérieure à laquelle j'ai participé¹⁸ a également montré qu'une supplémentation similaire en acides aminés et polyphénols permettait de réduire l'inflammation et les diarrhées causées par un challenge d'hébergement des porcelets en condition d'hygiène dégradée (Fraga et al., 2023). **Ces résultats illustrent l'intérêt des approches nutritionnelles pour renforcer la santé digestive des porcelets après le sevrage, notamment en ciblant le microbiote et son activité métabolique.**

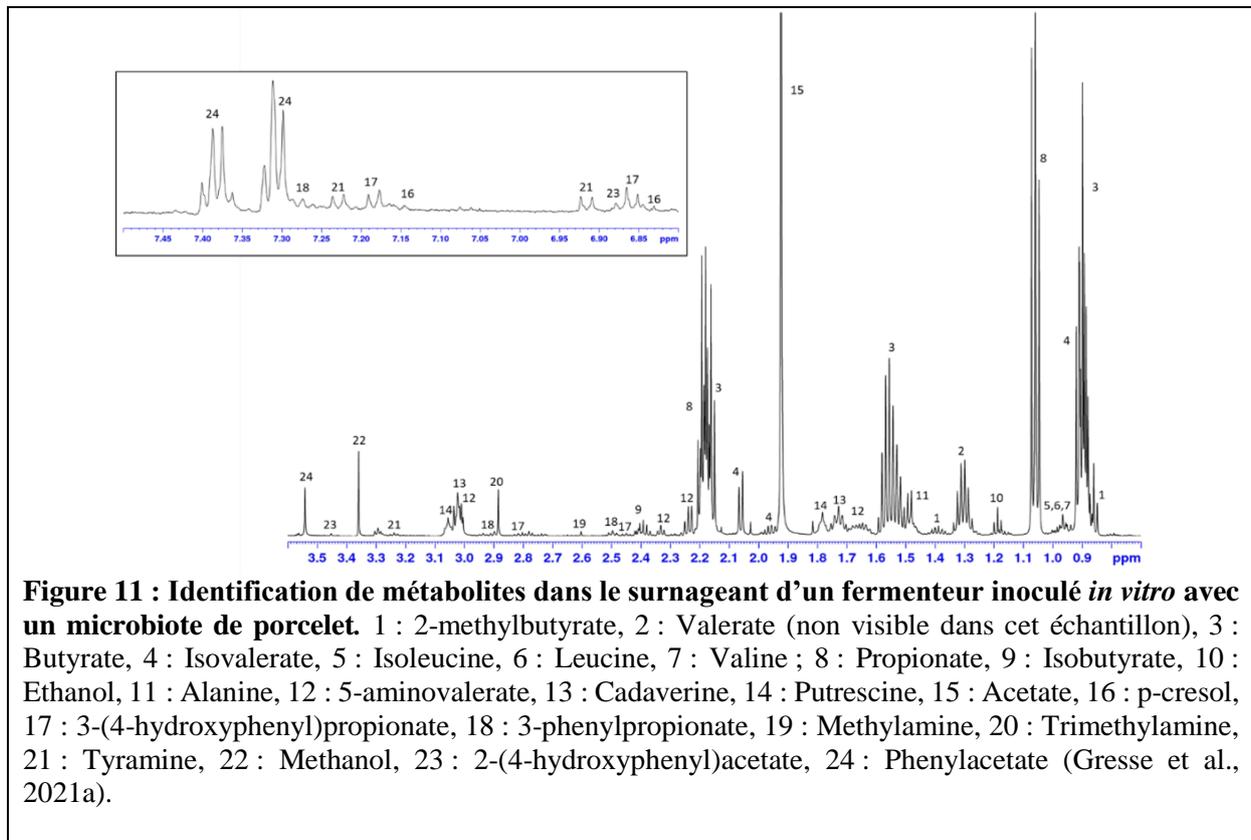
Les analyses de métabolome réalisées sur des échantillons de contenus digestifs présentent la limite de ne pas pouvoir distinguer l'origine des métabolites qui peuvent être issus de l'alimentation, ou du métabolisme de l'hôte ou du microbiote ou de leurs interactions. Au contraire, l'analyse du métabolome de fermenteurs inoculés *in vitro* par un microbiote digestif permet d'identifier clairement les métabolites issus des activités microbiennes. J'ai pu appliquer cette approche dans le cadre d'une collaboration¹⁹

¹⁷ Contrat de recherche avec l'entreprise Ajinomoto (fabricant d'acides aminés)

¹⁸ Contrat de recherche avec l'entreprise METEX (ex-Ajinomoto), coordonné par Nathalie Le Floc'h (UMR PEGASE, INRAE, Rennes)

¹⁹ Collaboration dans le cadre de la thèse CIFRE de Raphaëlle Gresse (UMR MEDIS à Clermont Ferrand et entreprise Lallemand)

au cours de laquelle j'ai étudié par RMN le métabolome de fermenteurs inoculés *in vitro* par un microbiote de porcelet et soumis à des perturbations mimant le sevrage (Figure 11). Les résultats que nous avons obtenus ont montré que l'arrêt de l'alimentation mimant l'anorexie couramment observée après le sevrage induit de manière transitoire une diminution de la concentration de métabolites produits par le microbiote (triméthylamine, acétate, méthanol, 5-aminovalérate) (Gresse et al., 2021a). Au contraire, nous n'avons pas mis en évidence de modulation du métabolome dans ce modèle dans le cas d'une infection par des *E. coli* enterotoxigénique, ce pathogène étant fréquemment impliqué dans les diarrhées post-sevrage des porcelets (Gresse et al., 2021b). **Ces travaux ont permis de montrer l'intérêt des modèles *in vitro* pour étudier l'activité métabolique du microbiote du porcelet dans le contexte du sevrage et pourraient être utilisés dans le futur pour valider l'origine bactérienne et les substrats précurseurs de métabolites d'intérêt associés à la santé digestive *in vivo*.** Ces modèles de fermentation *in vitro* présentent néanmoins des limites liées à une forte variabilité entre répétitions et au cours du temps, combinées à l'absence de reproduction du dialogue entre l'hôte et son microbiote.



Principaux résultats

- La période de transition alimentaire du sevrage est associée à d'importantes modifications de composition et d'activité métabolique du microbiote intestinal chez le lapin et le porc
- Les métabolites produits par le microbiote intestinal du lapin lors de l'introduction de l'alimentation solide renforcent la fonction de barrière de l'épithélium *in vitro*
- Une production élevée de triméthylamine par le microbiote des porcelets allaités est associée à l'apparition de diarrhées post-sevrage mais ce métabolite n'est pas délétère pour l'épithélium *in vitro*
- La modulation de la production de métabolites par le microbiote intestinal du porcelet au moment de la transition alimentaire du sevrage par des suppléments nutritionnels (polyphénols, acides aminés) est associée à des effets protecteurs pour la santé digestive

9.3 Développement de la culture d'organoïdes intestinaux pour étudier l'action du microbiote sur l'épithélium intestinal

Pour étudier le rôle des métabolites bactériens sur la barrière épithéliale de l'intestin, il est nécessaire de disposer de modèles d'étude de cellules épithéliales intestinales cultivées *in vitro*. En effet, les expérimentations *in vivo* ne permettent pas de connaître les effets directs d'un métabolite sur l'épithélium en raison des interactions possibles avec d'autres types cellulaires (ex : cellules immunitaires) ou avec le microbiote. De plus, la réduction du recours à l'expérimentation animale incluse dans par la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) est une attente sociétale forte. Cependant, les lignées de cellules épithéliales intestinales ne reflètent pas la complexité de l'épithélium, présentent des anomalies génomiques et ne sont pas disponibles chez toutes les espèces, comme le lapin. Les progrès récents dans la caractérisation de la niche des cellules souches de l'épithélium intestinal ont permis le développement de la culture d'organoïdes *in vitro* (Sato et al., 2009). Dans ce modèle de culture cellulaire autoorganisé en 3 dimensions, tous les types cellulaires de l'épithélium intestinal peuvent être présents et dérivent de cellules souches non-transformées et issues de l'espèce d'intérêt. Les organoïdes permettent également de mimer l'architecture et certaines des fonctions de l'épithélium intestinal. Il s'agit donc d'un modèle pertinent pour étudier l'action des métabolites bactériens sur l'épithélium intestinal. **Ainsi, j'ai développé la culture *in vitro* d'organoïdes d'intestin de lapin et de porc dans le but principal d'utiliser ces modèles pour étudier les effets du microbiote et de ses métabolites sur l'épithélium intestinal.**

9.3.1 Développement de la culture des organoïdes intestinaux de lapin

Lors de mon recrutement en 2018, il n'existait pas de modèle pour étudier *in vitro* (lignées cellulaires ou organoïdes) l'épithélium intestinal chez le lapin, espèce modèle utilisée dans notre équipe pour étudier les interactions avec le microbiote. Il aurait été possible de mettre en place le modèle de la culture d'explants de muqueuse intestinale mais ce choix n'a pas été fait dans la mesure où la viabilité des tissus *ex vivo* est limitée à quelques heures, ce qui n'est pas idéal pour étudier les effets de métabolites bactériens qui sont en contact de manière prolongée avec l'épithélium *in vivo*. De plus, ce modèle nécessite le sacrifice régulier d'animaux pour obtenir des tissus. C'est dans ce contexte que j'ai mené le projet MiniGut²⁰ dont le but était de mettre en place un modèle de culture d'organoïdes d'intestin de lapin grâce à des connaissances techniques acquises dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de Nathalie Vergnolle (IRSD, INSERM, Toulouse). Le travail mené par Eloïse Mussard que j'ai encadré lors de son stage de Master 2 a permis de cultiver des organoïdes de caecum de lapin en reproduisant *in vitro* la niche des cellules souches de l'épithélium intestinal en utilisant deux milieux de culture. Le premier milieu de culture est basé sur l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques permettant d'activer la voie de signalisation Wnt et d'inhiber la voie de signalisation BMP. Le second milieu de culture contient des protéines recombinantes de souris permettant également d'activer la voie Wnt et d'inhiber la voie BMP. Le caecum a été choisi pour isoler les cellules souches épithéliales en raison de l'intérêt de ce segment digestif pour étudier les interactions avec le microbiote chez le lapin (site majoritaire des activités fermentaires).

Nos résultats montrent que les deux méthodes testées permettent d'obtenir des organoïdes à partir de cryptes épithéliales cultivées dans un gel de matrice extracellulaire (Figure 12A-D). Ces organoïdes constitués d'une monocouche de cellules épithéliales peuvent être cultivés sur le long terme, cryoconservés et remis en culture. L'analyse de l'expression de gènes dans les organoïdes de caecum de lapin suggère que les principaux types de cellules épithéliales sont présentes (cellules souches, cellules absorbantes, cellules caliciformes, cellules productrices de peptides antimicrobiens et d'entéro-hormones). La caractérisation morphologique, l'analyse du profil d'expression de gènes et des approches d'imagerie en microscopie confocale nous ont permis de montrer que les organoïdes de caecum de lapin obtenus avec les inhibiteurs pharmacologiques prolifèrent rapidement et sont peu différenciés. En comparaison, les organoïdes cultivés avec les protéines recombinantes prolifèrent moins

²⁰ Projet financé par le département INRAE Phase

rapidement et ont un niveau de différenciation plus élevé. Ces différences phénotypiques sont probablement liées à des différences de niveau d'activation/d'inhibition des voies de signalisations impliquées dans le renouvellement et la différenciation épithéliale. Le milieu contenant les inhibiteurs pharmacologiques peut donc être utilisé pour générer rapidement *in vitro* un grand nombre de cellules souches d'intestin de lapin. Le milieu contenant les protéines recombinantes permet de produire des organoïdes contenant des cellules plus différenciées et donc mieux adapté aux études fonctionnelles de l'épithélium digestif du lapin.

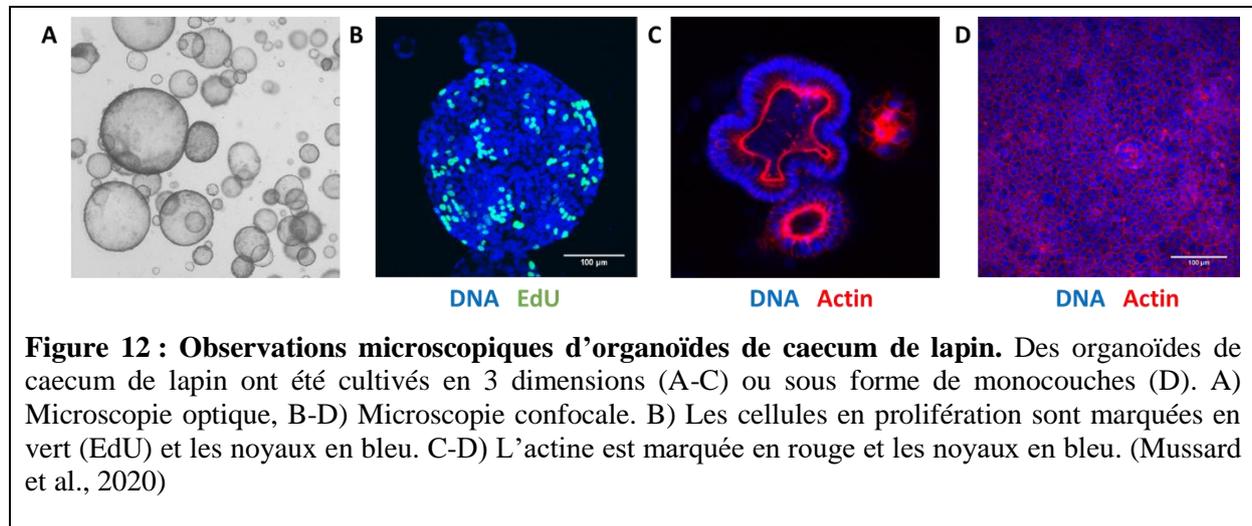


Figure 12 : Observations microscopiques d'organoïdes de caecum de lapin. Des organoïdes de caecum de lapin ont été cultivés en 3 dimensions (A-C) ou sous forme de monocouches (D). A) Microscopie optique, B-D) Microscopie confocale. B) Les cellules en prolifération sont marquées en vert (EdU) et les noyaux en bleu. C-D) L'actine est marquée en rouge et les noyaux en bleu. (Mussard et al., 2020)

Dans les organoïdes de caecum de lapin, quel que soit le milieu utilisé, le pôle apical des cellules épithéliales est situé à l'intérieur de la structure tridimensionnelle (Figure 12C). Il s'agit d'un inconvénient pour étudier les effets de composés présents dans la lumière intestinale (ex : métabolites bactériens, nutriments) dans la mesure où le pôle apical des cellules épithéliales n'est pas accessible dans les organoïdes. Nous avons donc mis au point une méthode de culture de cellules d'organoïdes de caecum de lapin en monocouche sur des inserts (Figure 12D). Dans ces conditions, le pôle apical des cellules est accessible pour l'exposition à des composés lumineux. Cette technique permet également d'étudier la fonction de barrière de l'épithélium (mesure de TEER et de perméabilité).

L'ensemble de ces résultats a été publié dans le premier article présentant une méthode pour cultiver des organoïdes intestinaux de lapin (Mussard et al., 2020). La plupart de nos résultats ont été confirmés l'année suivante dans une publication du laboratoire de Robyn Hall (CSIRO, Australie) avec lequel nous échangeons sur nos avancées techniques (Kardia et al., 2021). Ce laboratoire développait les organoïdes dans le but d'étudier les infections par les Lagovirus. Plus récemment, nous avons été sollicités par le laboratoire de Stéphane Bertagnoli (UMR IHAP, INRAE, Toulouse) pour cultiver le virus de la maladie hémorragique virale du lapin (RHDV), un pathogène majeur des lapins. Dans ce cadre, nous avons fourni des organoïdes de lapins issus de différents segments digestifs (duodénum, caecum) qui sont utilisés dans l'UMR IHAP pour tenter de les infecter par différentes souches de RHDV. Cette collaboration illustre l'intérêt du modèle d'organoïdes d'intestin de lapin que nous avons développé pour étudier les relations hôte-pathogène. Au laboratoire, nous utilisons actuellement les organoïdes de caecum de lapin pour étudier les effets des métabolites produits par le microbiote lors de l'introduction de l'alimentation solide, comme décrit ci-dessus (Beaumont et al., 2020). Enfin, le développement des organoïdes d'intestin de lapin a été une étape préliminaire essentielle à l'obtention du projet ANR JCJC MetaboWean dont le programme de recherche impliquant ce modèle est détaillé ci-dessous dans la partie consacrée au projet. Dans ce cadre, la caractérisation de ce modèle sera poursuivie et les conditions de culture seront optimisées pour mimer plus fidèlement les populations cellulaires présentes dans l'intestin du lapin *in vivo*, notamment en s'appuyant sur des données de transcriptomique en cellule unique.

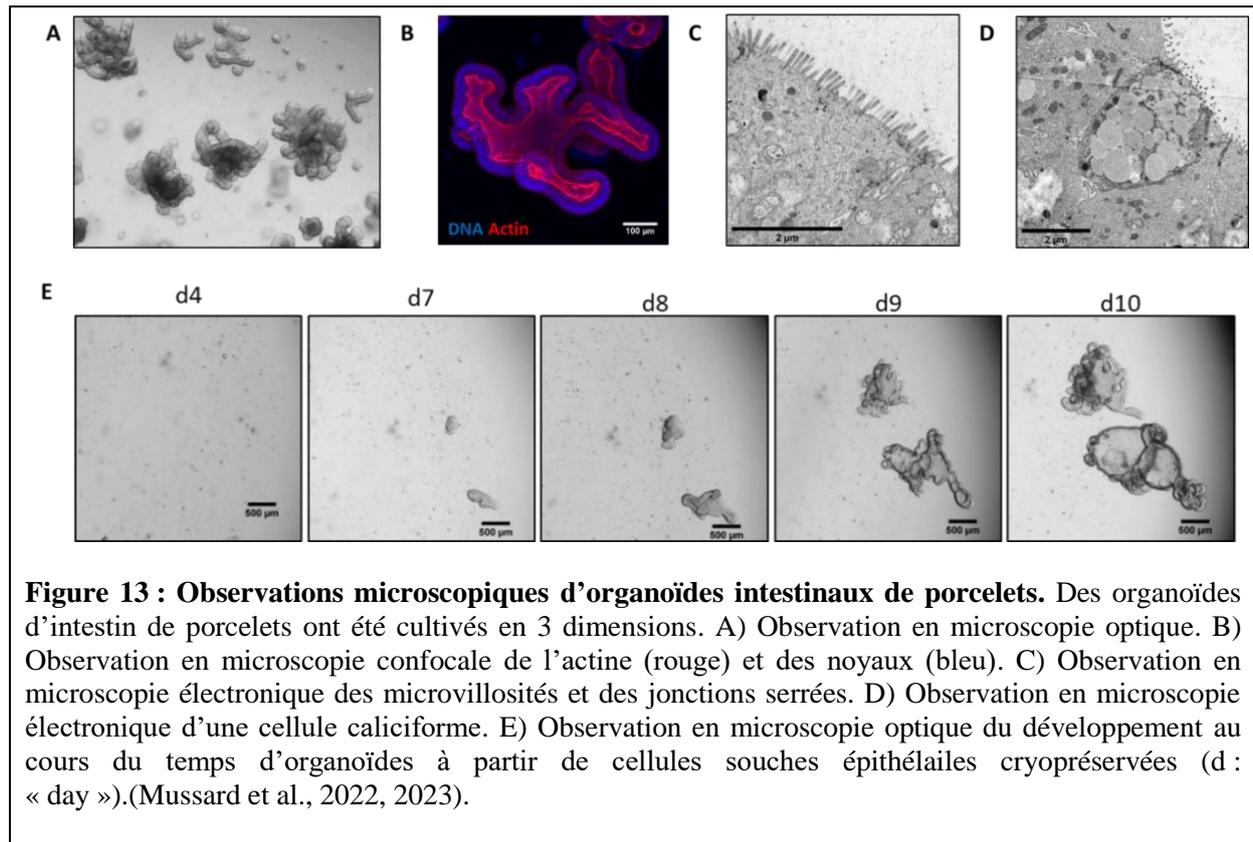
9.3.2 Développement de la culture des organoïdes d'intestin de porcelets

La culture d'organoïdes intestinaux de porcs a été décrite pour la première fois en 2013 (Gonzalez et al., 2013) et ce modèle a été utilisé principalement pour des applications dans le domaine de l'étude des interactions hôte-pathogène (Derricott et al., 2019; Li et al., 2019). Pour utiliser ce nouveau modèle de manière pertinente dans le contexte de l'étude des effets des métabolites bactériens sur la barrière épithéliale lors du sevrage, nous avons besoin d'approfondir la caractérisation des organoïdes intestinaux de porc pour déterminer leur capacité à maintenir le phénotype de leur tissu d'origine en lien avec i) la localisation dans l'intestin (les interactions avec le microbiote intestinal étant fortement régionalisées (Agace and McCoy, 2017)) et ii) le stade de développement (avant et après sevrage). Ces questions ont été traitées par Eloïse Mussard lors de sa thèse CIFRE (entreprise Lallemand) que j'ai co-encadré avec Sylvie Combes et qui a été réalisée dans le cadre du projet OrganoPig²¹ que j'ai coordonné.

La première étape de ce projet a été consacrée à la création d'une biobanque d'organoïdes obtenus à partir de deux segments digestifs (jéjunum et côlon) prélevés sur des porcelets allaités ou sevrés.

Cette étape a été réalisée en collaboration avec Laura Soler (TOXALIM, INRAE, Toulouse) pour son expertise en physiologie intestinale porcine. La culture des cellules souches épithéliales porcines dans un gel de matrice extracellulaire et avec un milieu de culture commercial reproduisant la niche des cellules souches nous a permis d'obtenir des structures autoorganisées en 3 dimensions avec des bourgeons mimant les cryptes épithéliales (Figure 13A-D). Nos données d'imagerie et d'expression de gènes montrent que ces organoïdes sont formés d'une monocouche de cellules polarisées, jointives et représentatives de divers types cellulaires (cellules absorbantes, cellules caliciformes, cellules entéroendocrines, cellules en prolifération). Dans le cadre d'une collaboration avec Gaëlle Boudry (NUMECAN, INRAE, Rennes), nous avons également mis au point une technique permettant d'obtenir des organoïdes intestinaux de porcelets à partir de cryptes épithéliales congelées (Figure 13E), ce qui présente l'avantage de pouvoir dissocier dans le temps le moment d'isolement des cryptes et leur mise en culture afin de faciliter l'organisation du travail (Mussard et al., 2023). Un autre avantage de cette technique de culture à partir de cryptes congelées est de pouvoir choisir les individus utilisés pour cultiver des organoïdes après avoir obtenu des données de phénotypage permettant d'identifier les échantillons les plus intéressants (ex : individus présentant un profil particulier d'expression de gènes d'intérêt, comme décrit ci-dessous pour l'étude du microbiote primocolonisant).

²¹ Projet Financé par l'institut Carnot France Futur Elevage et mené en partenariat avec l'UMR TOXALIM et l'entreprise Lallemand



L'analyse de l'expression d'un panel de gènes impliqués dans diverses fonctions de l'épithélium intestinal nous a permis de montrer que **les organoïdes intestinaux de porcelet conservent un phénotype spécifique à leur localisation d'origine (jéjunum ou côlon)** (Figure 14A et B). En effet, environ 50% des gènes différentiellement exprimés en fonction du segment digestif *in vivo* (cryptes) sont également différentiellement exprimés dans les organoïdes issus de ces segments (de la primoculture au 2^e passage). Cette observation signifie que les organoïdes intestinaux de porc peuvent être utilisés de manière relativement spécifique à une région de l'intestin, par exemple pour étudier l'effet des métabolites dérivés du microbiote intestinal dans différents segments du tractus digestif. Les données que nous avons obtenues nous permettent de connaître les gènes dont le profil d'expression régionale est maintenu dans les organoïdes et pouvant être ciblés dans des études ultérieures. En revanche, **le phénotype spécifique au stade de développement (porcelets allaités vs porcelets sevrés) a été effacé dans les organoïdes**, probablement parce que les facteurs qui déterminent l'expression des gènes spécifiques au stade de développement *in vivo* sont absents *in vitro*. En particulier, la présence du microbiote intestinal et de ses métabolites semble cruciale et ouvre la possibilité d'améliorer la pertinence physiologique des organoïdes en ajoutant des produits microbiens dans le milieu de culture. Une publication a présenté ces résultats qui ont permis de progresser dans la caractérisation des organoïdes intestinaux de porc (Mussard et al., 2022). Nos résultats sont globalement en accord avec ceux publiés récemment par d'autres équipes sur des organoïdes porcins (Mohammad et al., 2020; Barnett et al., 2021). L'ensemble de ces nouvelles données pourra guider l'utilisation optimale des organoïdes intestinaux de porc et de favoriser leur développement en tant que modèle *in vitro* innovant permettant de réduire l'expérimentation sur les porcs vivants.

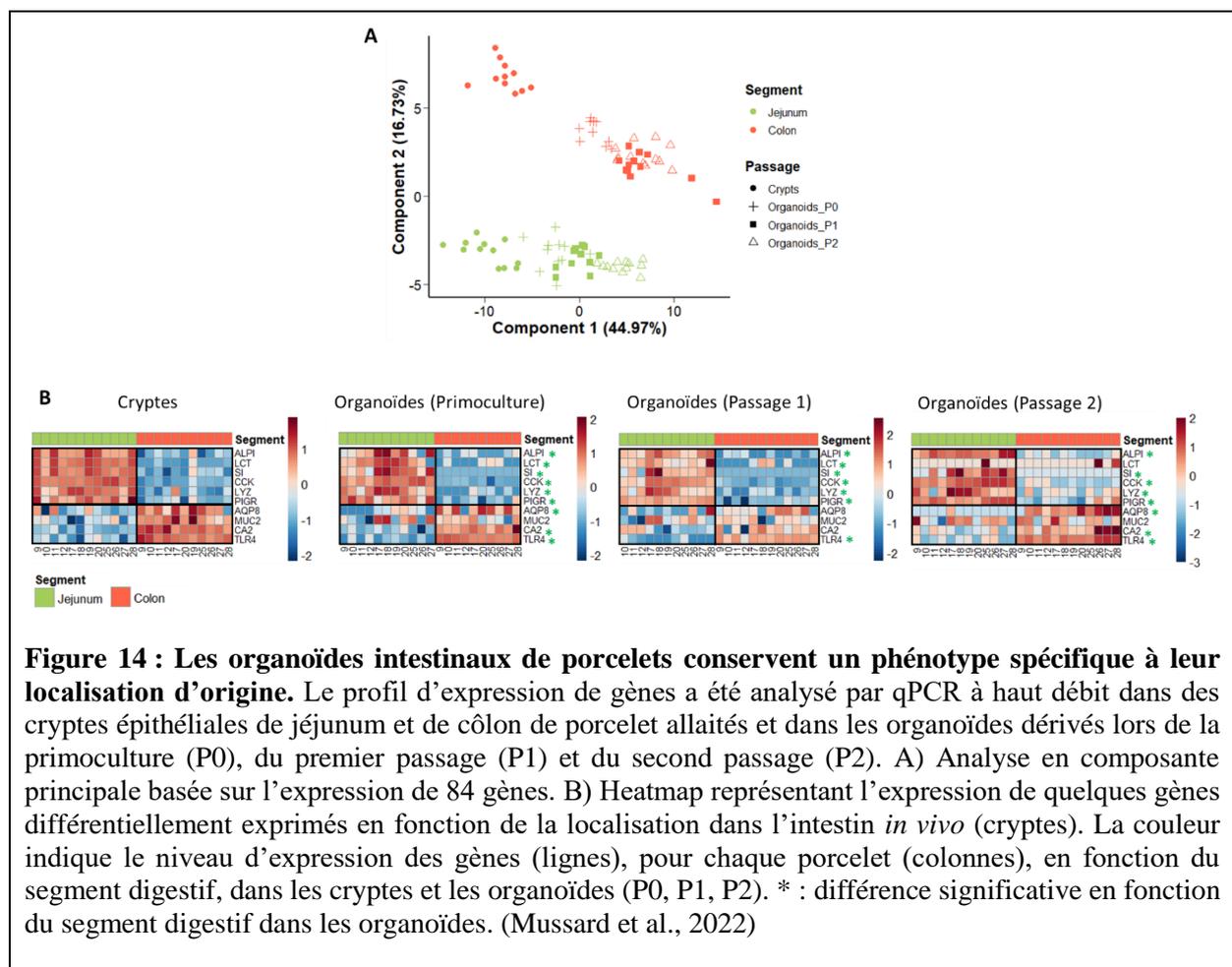


Figure 14 : Les organoïdes intestinaux de porcelets conservent un phénotype spécifique à leur localisation d'origine. Le profil d'expression de gènes a été analysé par qPCR à haut débit dans des cryptes épithéliales de jéjunum et de côlon de porcelet allaités et dans les organoïdes dérivés lors de la primoculture (P0), du premier passage (P1) et du second passage (P2). A) Analyse en composante principale basée sur l'expression de 84 gènes. B) Heatmap représentant l'expression de quelques gènes différentiellement exprimés en fonction de la localisation dans l'intestin *in vivo* (cryptes). La couleur indique le niveau d'expression des gènes (lignes), pour chaque porcelet (colonnes), en fonction du segment digestif, dans les cryptes et les organoïdes (P0, P1, P2). * : différence significative en fonction du segment digestif dans les organoïdes. (Mussard et al., 2022)

Dans le but d'étudier les effets de métabolites produits par le microbiote sur l'épithélium du porcelet, nous avons souhaité mettre en place la culture de monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets afin d'accéder au pôle apical des cellules épithéliales, comme décrit ci-dessus pour le lapin. Bien que la méthode nécessaire à l'obtention de ce modèle ait été décrite (van der Hee et al., 2018), nous avons rencontré d'importantes difficultés pour l'utiliser dans notre laboratoire de manière reproductible. Grâce au séjour réalisé dans le cadre du programme Agreenium de Eloïse Mussard dans le laboratoire de Christian Klotz (Institut Robert Koch, Berlin, Allemagne), expert dans la culture de monocouches de cellules d'organoïdes issus de diverses espèces (Holthaus et al., 2021), nous avons pu définir un protocole standardisé pour obtenir de manière reproductible des monocouches de cellules organoïdes de porcelets formant une barrière épithéliale étanche et composées de plusieurs types de cellules épithéliales (Figure 15 A-E).

Nous avons publié une version détaillée de ce protocole accompagné d'une vidéo décrivant les techniques utilisées pour obtenir et caractériser les monocouches de cellules d'organoïdes d'intestin de porcelets (Mussard et al., 2023). Les pistes d'amélioration de ce modèle concernent désormais i) la complexification de la composition cellulaire, notamment pour inclure les cellules immunitaires, ii) la reproduction des écoulements de fluides et iii) la présence du microbiote. Le développement d'intestins sur puce pourrait permettre de dépasser ces limites actuelles (cf. partie projet).

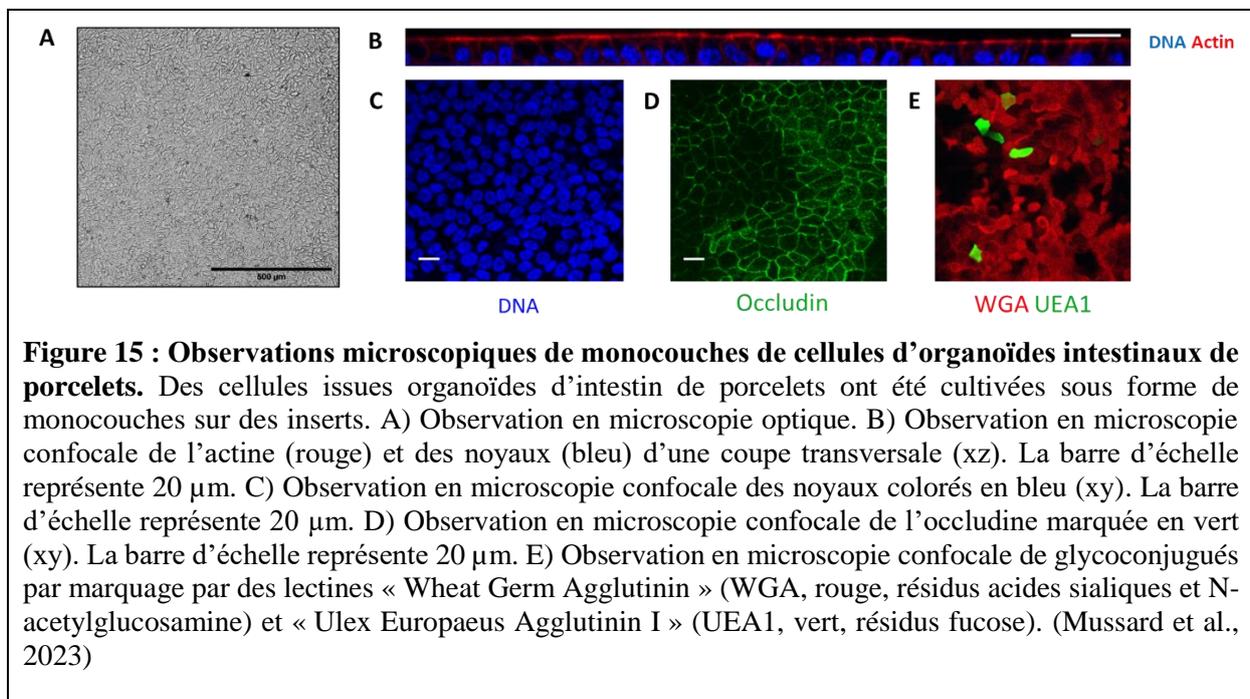
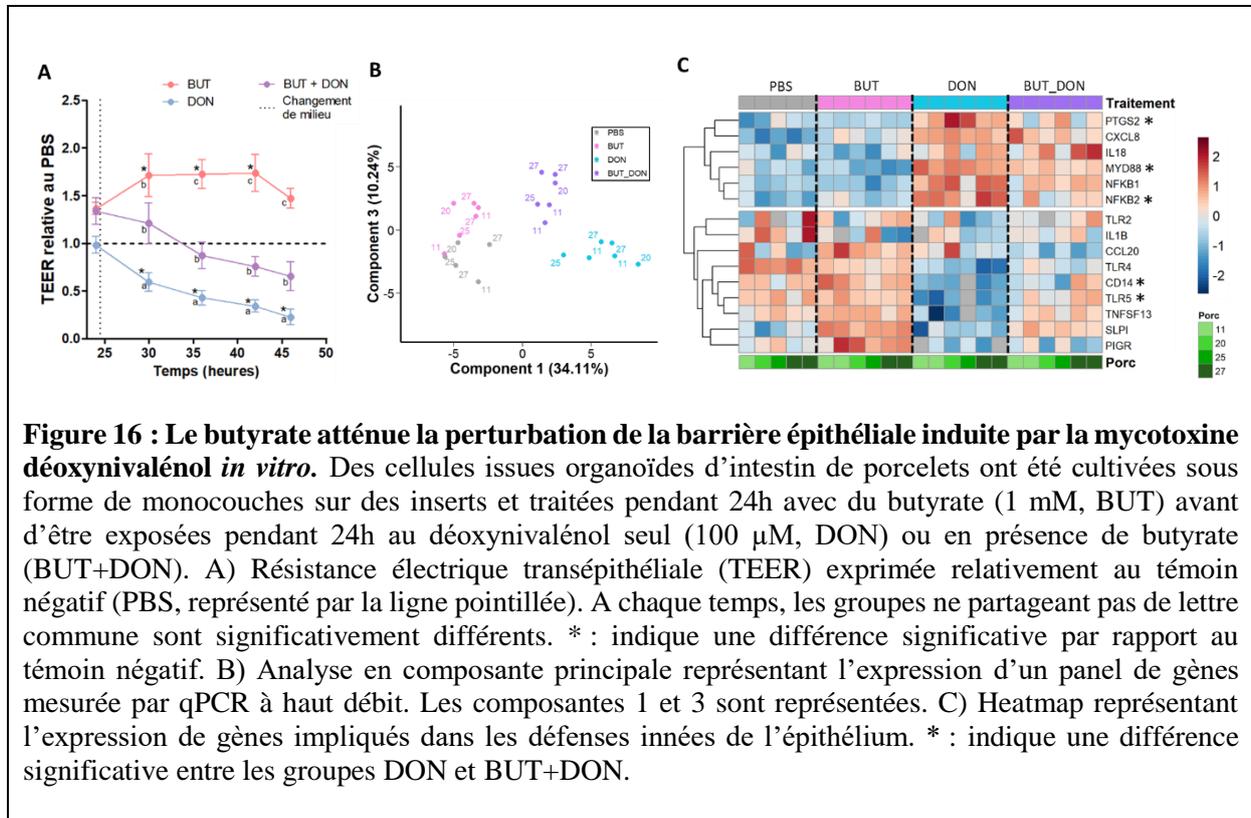


Figure 15 : Observations microscopiques de monocouches de cellules d'organoïdes intestinaux de porcelets. Des cellules issues organoïdes d'intestin de porcelets ont été cultivées sous forme de monocouches sur des inserts. A) Observation en microscopie optique. B) Observation en microscopie confocale de l'actine (rouge) et des noyaux (bleu) d'une coupe transversale (xz). La barre d'échelle représente 20 µm. C) Observation en microscopie confocale des noyaux colorés en bleu (xy). La barre d'échelle représente 20 µm. D) Observation en microscopie confocale de l'occludine marquée en vert (xy). La barre d'échelle représente 20 µm. E) Observation en microscopie confocale de glycoconjugués par marquage par des lectines « Wheat Germ Agglutinin » (WGA, rouge, résidus acides sialiques et N-acetylglucosamine) et « Ulex Europaeus Agglutinin I » (UEA1, vert, résidus fucose). (Mussard et al., 2023)

Nous avons souhaité développer un modèle de dysfonction de la barrière épithéliale intestinale dans le modèle des monocouches des cellules d'organoïdes d'intestin de porcelets, dans l'optique de tester les effets potentiellement protecteurs de métabolites produits par le microbiote. Pour cela, dans le cadre d'une collaboration avec l'UMR TOXALIM (Laura Soler, Philippe Pinton et Isabelle Oswald), nous avons utilisé le déoxynivalénol (DON), une mycotoxine pouvant contaminer les céréales et connue pour ses effets délétères sur l'intestin, en particulier chez le porcelet (Pinton and Oswald, 2014). Nos résultats montrent que le DON augmente la perméabilité paracellulaire, réduit la différenciation épithéliale et perturbe l'expression de nombreux gènes liés à l'immunité innée dans les monocouches de cellules d'organoïdes d'intestin de porcelets (Figure 16A-C). Suite à la thèse de Eloïse Mussard, les expériences menées dans le cadre du stage de Master 2 de Julie Alberge que j'ai encadrée ont montré que le butyrate, un des principaux métabolites produit par le microbiote intestinal, permet d'atténuer les effets délétères du DON sur la fonction de barrière de l'épithélium et les défenses immunitaires innées (Figure 16A-C). Nos résultats obtenus avec la ribotoxine anisomycine suggèrent que le butyrate pourrait s'opposer à

l'inhibition de la synthèse protéique induite par le DON. Une publication est en préparation pour présenter ces résultats (Alberge, Mussard et al., en préparation). Cette étude apporte la **preuve de concept que le modèle des monocouches de cellules d'organoïdes d'intestin de porcelets permet de mettre en évidence les effets de métabolites produits par le microbiote intestinal sur la fonction de barrière de l'épithélium intestinal.**



Nos travaux sur la culture des organoïdes intestinaux de porcs nous ont permis d'établir plusieurs collaborations pour lesquelles notre rôle consiste principalement à transférer des organoïdes cryoconservés ainsi que l'expertise pour leur culture dans le but de les utiliser dans divers contextes incluant par exemple i) l'induction d'épimutations dans l'épithélium intestinal (Guillaume Devailly, UMR GenPhySE, INRAE, Toulouse) et ii) l'étude de l'infection par le pathogène entérique *Streptococcus suis* (François Meurens, Faculté Vétérinaire de Sainte Hyacinthe, Canada). Notre expertise sur les organoïdes issus d'espèces non modèles nous conduit également à être sollicités pour aider à l'établissement de nouveaux modèles d'organoïdes issus de divers organes et espèces, par exemple pour développer des organoïdes de glande mammaire bovine (UMR IHAP, INRAE, Toulouse) ou des organoïdes d'intestin de xénope (LEFE, CNRS, Toulouse). Ces expérimentations sont actuellement en cours. Dans le cadre d'une collaboration avec Hervé Acloque (UMR GABI, INRAE, Jouy-en-Josas), nous envisageons également de comparer la composition cellulaire et la fonctionnalité des organoïdes d'intestin de porcs issus de cellules souches isolées d'intestin ou de cellules souches embryonnaires porcines. En effet, chez l'homme, la complexité cellulaire des organoïdes intestinaux dérivés de cellules souches pluripotentes embryonnaires ou induites est nettement supérieure à celle des organoïdes dérivés des cellules souches intestinales puisque, en plus des cellules épithéliales, ils peuvent contenir des cellules du mésenchyme, de l'endothélium et des neurones (Holloway et al., 2020). Ce projet fait actuellement l'objet de demandes de financement portées par Hervé Acloque.

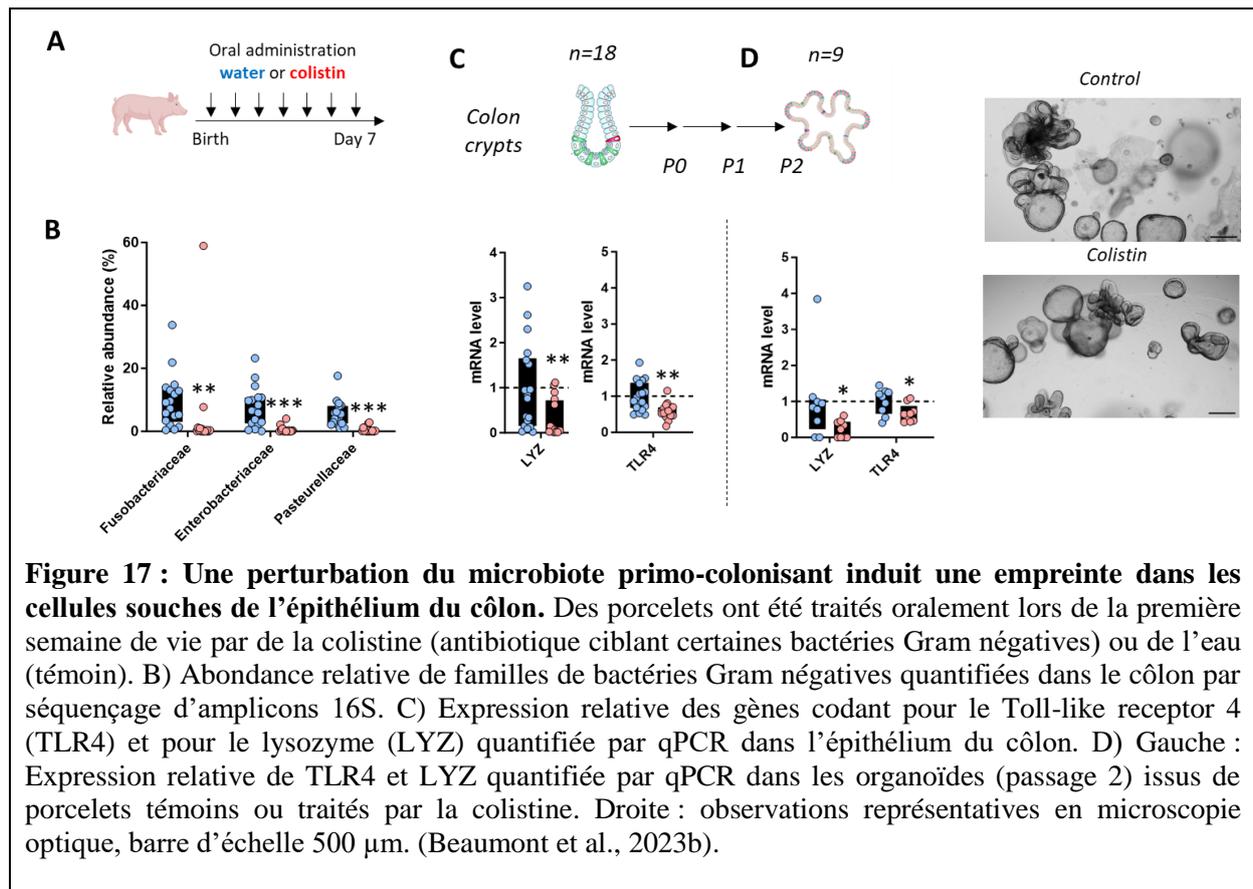
9.3.3 Utilisation des organoïdes d'intestin de porcelets pour étudier l'effet du microbiote primo-colonisant sur l'épithélium intestinal

Le microbiote primo-colonisant joue un rôle important dans le développement post-natal de l'épithélium intestinal et ce processus a des conséquences à long terme pour le fonctionnement de l'intestin (Al Nabhani and Eberl, 2020). Nous avons fait l'hypothèse que les bactéries primo-colonisatrices pourraient influencer durablement le fonctionnement de l'épithélium intestinal via l'induction d'une empreinte épigénétique dans les cellules souches épithéliales intestinales qui persistent à long terme dans l'épithélium. Les organoïdes intestinaux constituent un outil particulièrement intéressant pour étudier la biologie des cellules souches épithéliales intestinales dont ils sont issus. Dans le cadre d'un projet²² que j'ai coordonné avec Gaëlle Boudry (UMR NUMECAN, INRAE, Rennes), **nous avons donc proposé d'utiliser les organoïdes intestinaux de porcelets pour étudier les conséquences d'une modification du microbiote primo-colonisant sur le fonctionnement des cellules souches épithéliales intestinales.**

Nous avons traité des porcelets lors de la première semaine de vie avec de la colistine, un antibiotique ciblant certaines bactéries Gram négatives (Figure 17A) (Beaumont et al., 2023b). Ce traitement a permis de réduire très fortement la colonisation de l'intestin des porcelets par les Proteobacteria et les Fusobacteria, ces phyla étant abondants dans le microbiote du porcelet nouveau-né (~20%) (Figure 17B). Cette modification de la composition du microbiote était associée à une modification de son activité métabolique (ex : augmentation de la concentration de succinate dans le côlon et diminution de la capacité à produire du LPS) et à la régulation de l'expression de gènes dans l'épithélium intestinal. En particulier, nous avons observé que l'expression du peptide antimicrobien lysozyme (LYZ) et du Toll-like receptor 4 (TLR4) était réduite chez les porcelets traités par la colistine en comparaison des témoins (Figure 17C).

Afin de déterminer si cette modulation des défenses épithéliales immunitaires innées pouvait persister sur le long terme via une empreinte au niveau des cellules souches, nous avons cultivé des organoïdes issus de cryptes congelées que nous avons isolées des porcelets témoins ou traités par la colistine. Nous avons constaté que le niveau d'expression de LYZ et TLR4 demeurait inférieur dans les organoïdes issus des porcelets traités par la colistine en comparaison des témoins et cela après deux passages permettant d'éliminer tout stimuli microbiens résiduels (Figure 17D). Ces résultats suggèrent que la modification du microbiote primo-colonisant résultant du traitement par la colistine a induit une empreinte épigénétique dans les cellules souches épithéliales des porcelets. Nous avons alors mis en place une collaboration avec Guillaume Devailly (UMR GenPhySE, INRAE, Toulouse) pour tester si cette empreinte épigénétique impliquait des modifications post-traductionnelles au niveau des histones. Cependant, nos résultats ont montré que l'abondance de la triméthylation de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4me3) était similaire au niveau du promoteur du gène LYZ dans les organoïdes issus de porcelets témoins ou traités à la colistine. D'autres types de modifications épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN sont probablement impliqués dans l'empreinte observée au niveau des cellules souches (Kraiczky et al., 2019). Par ailleurs, nous avons utilisé un modèle de monocouches de cellules issues d'organoïdes de côlon de porcelets nouveau nés pour tester si le succinate (dont la concentration était augmentée par la colistine), le LPS (issu des bactéries gram négatives) ou la colistine pouvaient être responsables de la diminution de l'expression du LYZ et du TLR4 observées lors de la modification du microbiote primo-colonisant. Nos résultats suggèrent que ces traitements ne sont pas suffisants pour modifier l'expression de ces gènes et que d'autres mécanismes sont impliqués, tel que la modification globale de l'écosystème intestinal induit par le traitement par la colistine.

²² Projet « HoloPig » financé par le métaprogramme INRAE HoloFlux



Bien que les mécanismes moléculaires n'aient pas été élucidés, **ce projet nous a permis de montrer que la modification du microbiote primo-colonisant induit une empreinte au niveau des cellules souches épithéliales intestinales.** Compte tenu de la persistance des cellules souches au cours du temps dans l'intestin, ce phénomène d'empreinte pourrait avoir des conséquences à long terme pour le fonctionnement de l'épithélium. Il serait donc intéressant de déterminer si la modification du microbiote primo-colonisant des porcelets a des conséquences durables pour leur susceptibilité à des pathologies infectieuses ou métaboliques. **Ce projet nous a également permis de montrer l'intérêt de l'utilisation des organoïdes intestinaux pour étudier les conséquences d'une modification du microbiote intestinal sur le fonctionnement des cellules souches épithéliales.** Des dispositifs expérimentaux similaires pourraient être appliqués dans de nombreux contextes, tels qu'un changement de microbiote induit par une modification de l'alimentation, par une infection ou encore en fonction du stade de développement. Il est néanmoins possible que cette empreinte induite par le microbiote lors de la première semaine de vie soit plus difficile à reproduire dans des organoïdes issus d'animaux plus âgés. En effet, il existerait une « fenêtre d'opportunité » au début de la vie pendant laquelle le fonctionnement de l'intestin serait particulièrement sensible à l'induction d'une programmation par le microbiote (Al Nabhani and Eberl, 2020). Chez le porcelet, cette fenêtre d'opportunité pendant laquelle le microbiote induit une empreinte dans les cellules souches intestinales pourrait être limitée à la première semaine de vie puisque nous n'avons pas observé de différence de phénotype entre les organoïdes issus de porcelets allaités (21 jours) et sevrés (35 jours) alors que des différences majeures de composition du microbiote étaient observées *in vivo* entre ces deux groupes d'animaux (Mussard et al., 2022). L'ensemble de ces hypothèses nécessiterait une validation expérimentale.

9.3.4 Participation à des activités collectives pour le développement des modèles d'organoïdes

Ma participation au groupe de travail INRAE « Organoïdes et modèles *ex vivo* chez les espèces animales d'intérêt agronomique » me permet d'être en contact avec les équipes INRAE utilisant les organoïdes d'intestin et d'autres organes. Ce réseau permet des échanges sur les techniques utilisées. Dans ce cadre, j'ai participé à l'organisation d'un séminaire intitulé « Défis et perspectives d'applications des organoïdes en biologie animale » (virtuel, 2021). Ce séminaire a permis la présentation des travaux en cours utilisant la culture d'organoïdes de multiples organes (intestin, foie, cerveau, muscle, ovaire, etc.) chez les espèces d'intérêt agronomique (porc, lapin, poulet, bovin, etc.). En 2022, j'ai coordonné, avec l'aide d'un comité d'organisation de 8 scientifiques, l'organisation d'une nouvelle édition du séminaire, intitulé « Organoïdes et recherche agronomique » (<https://seminaire.inrae.fr/organoïdes/>). Ce séminaire a eu lieu à l'école vétérinaire d'Alfort (ENVA) et a réuni plus de 80 participants, principalement des scientifiques INRAE mais également des représentants de l'industrie (alimentation animale), ce qui illustre l'intérêt grandissant de l'utilisation d'organoïdes pour des travaux de recherche appliquée. En 2023, j'ai participé au comité local d'organisation d'une école thématique portée par le CNRS sur les organoïdes (140 participants). A l'occasion de cet événement, j'ai pris en charge une session de travaux dirigés consacrée à la transcriptomique en cellule unique appliquée aux organoïdes, en collaboration avec Emeline Lhuillier (GeT-Santé, Toulouse) et Tania Malonga, doctorante que je co-encadre. En 2024, je participe à l'organisation d'une nouvelle édition du séminaire INRAE sur les organoïdes.

Le groupe de travail INRAE a également rédigé une série d'articles de synthèse sur les organoïdes d'animaux d'élevage, publiés dans un numéro spécial de la revue *Veterinary Research*. **J'ai mené la rédaction de l'article de revue consacré aux organoïdes intestinaux chez les animaux d'élevage, en collaboration avec 6 scientifiques INRAE utilisant ces modèles** (Beaumont et al., 2021a). Ce travail m'a permis de renforcer mes liens avec les collègues INRAE travaillant avec des organoïdes intestinaux et d'accroître la visibilité de mon travail au niveau international. En effet, j'ai été invité à présenter nos travaux sur les organoïdes au congrès EAAP (2022), lors d'une école d'été sur les organoïdes chez les animaux d'élevage (EuroFAANG, 2023) et lors d'un séminaire au Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center de l'Université de Montréal (2023).

Principaux résultats

- Développement de méthodes permettant de cultiver des organoïdes intestinaux de lapin
- Démonstration de la capacité des organoïdes d'intestin de porcelets à maintenir un phénotype lié au segment digestif alors que les caractéristiques liées au stade de développement sont effacées
- Optimisation de la méthode de culture des cellules d'organoïdes intestinaux de porcs en monocouches pour étudier les interactions avec le microbiote et ses métabolites
- Démonstration de la capacité du butyrate à réduire la dysfonction de la barrière épithéliale induite par la mycotoxine déoxynivalénol dans le modèle des monocouches de cellules d'organoïdes intestinaux de porcelet
- Mise en évidence d'une empreinte induite par le microbiote primo-colonisant dans les cellules souches épithéliales intestinales grâce à l'utilisation des organoïdes de porcelets

10. PROJET : ACTIVITES DE RECHERCHE EN COURS ET PERSPECTIVES

Mes travaux de recherche ont contribué à mettre en évidence l'importance des métabolites dans l'action du microbiote intestinal sur les cellules de son hôte animal. Cependant, seule une minorité des nombreux métabolites produits par les bactéries ont été étudiés pour leurs effets sur l'épithélium intestinal et leurs cibles cellulaires et moléculaires restent généralement peu connues. C'est dans ce contexte que **je souhaite poursuivre l'étude de l'action des métabolites produits par le microbiote sur l'épithélium intestinal des jeunes animaux avec l'objectif de comprendre leurs mécanismes d'action**. Ce projet sera mené chez les deux espèces lapin ou porc, en fonction de la pertinence expérimentale, des perspectives d'applications envisagées et des possibilités de financement.

L'originalité de ce projet sera de prendre en compte la diversité des cellules épithéliales dans la réponse aux métabolites produits par le microbiote. En effet, le fonctionnement de l'épithélium intestinal repose sur l'action coordonnée de différents types cellulaires spécialisés (cellules souches, cellules absorbantes, cellules caliciformes, cellules de Paneth, cellules Tuft, cellules entéroendocrines) (Gehart and Clevers, 2019) mais cette hétérogénéité cellulaire a peu été prise en compte dans l'étude de la co-maturation du microbiote et de l'épithélium au début de la vie. De plus, il a été montré que l'action des métabolites bactériens peut différer en fonction du type de cellule épithéliale considérée. Par exemple, le butyrate exerce des effets opposés sur les cellules souches et sur les cellules absorbantes matures en raison de leurs différences de capacité à oxyder ce métabolite bactérien (Kaiko et al., 2016; Salvi and Cowles, 2021). Les progrès récents dans les technologies de transcriptomique en cellule unique représentent une opportunité majeure pour étudier l'action des métabolites produits par le microbiote sur chaque cellule composant l'épithélium intestinal.

Dans la première partie de ce projet, je présente la stratégie que je souhaite employer pour identifier les processus de maturation induits dans chaque type cellulaire de l'épithélium intestinal lors de l'introduction de l'alimentation solide (Figure 18). La seconde partie de ce projet est consacrée à l'identification de métabolites contribuant au développement de la barrière épithéliale au début de la vie et à l'étude de leurs modes d'action en prenant en compte les spécificités de chaque type cellulaire. Les modèles d'organoïdes précédemment développés au laboratoire sont particulièrement adaptés puisqu'ils ont la capacité de reproduire *in vitro* la diversité des cellules épithéliales observée *in vivo*. Un effort particulier sera apporté pour **complexifier les conditions de culture des organoïdes de manière à mimer fidèlement les populations cellulaires de l'épithélium ainsi que leur microenvironnement et les conditions dynamiques d'exposition aux métabolites bactériens**. Ces développements technologiques pourront être basés notamment sur l'utilisation de systèmes microphysiologiques appelés « intestins sur puce ». Enfin, je souhaite que les nouvelles connaissances obtenues sur les effets de métabolites produits par le microbiote intestinal puissent aboutir à moyen terme à des innovations nutritionnelles dans le domaine de la santé vétérinaire. La troisième partie de mon projet est consacrée à la conception d'un cadre expérimental permettant de **développer des stratégies nutritionnelles visant à renforcer la barrière intestinale au début de la vie en ciblant les métabolites produits par le microbiote**.

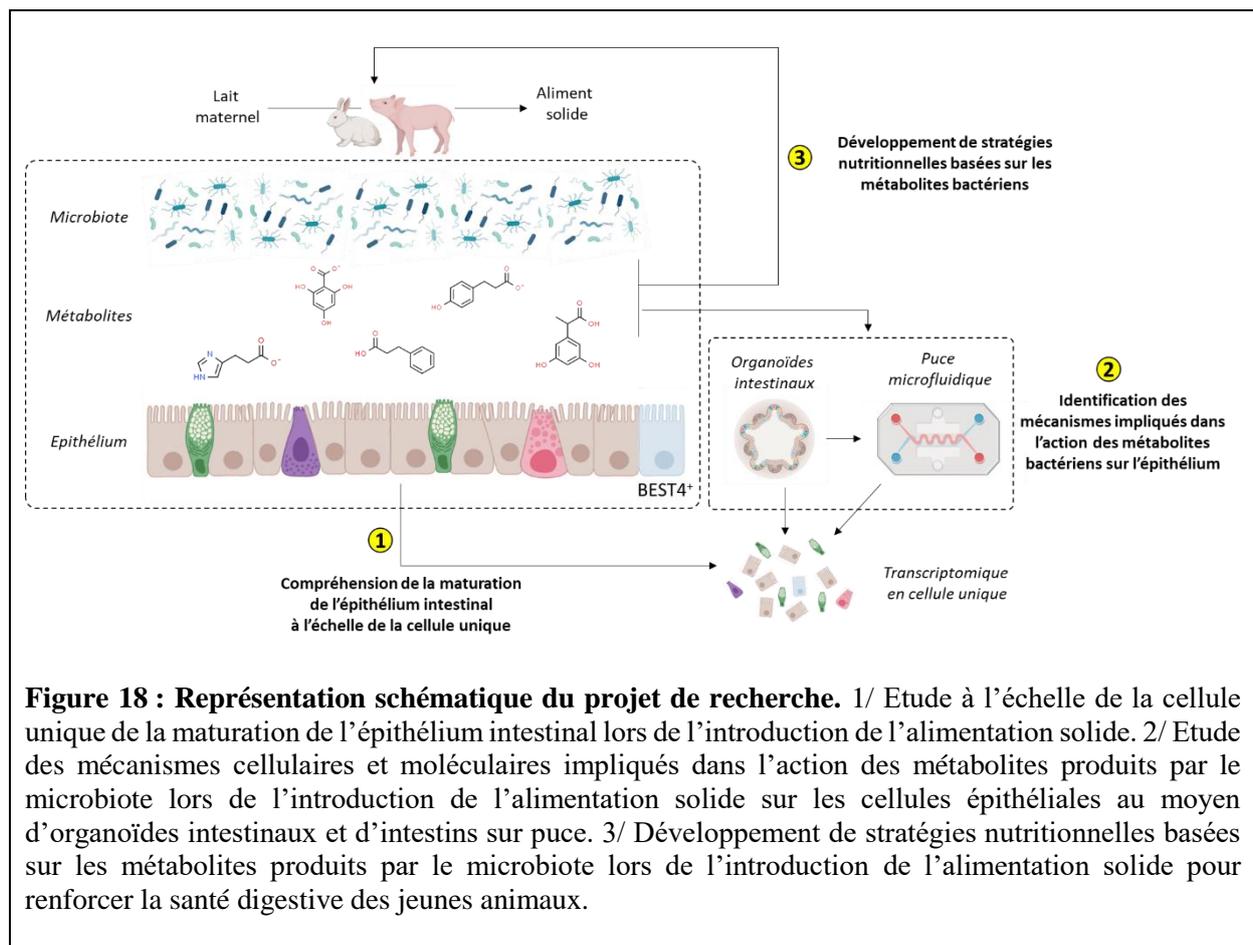


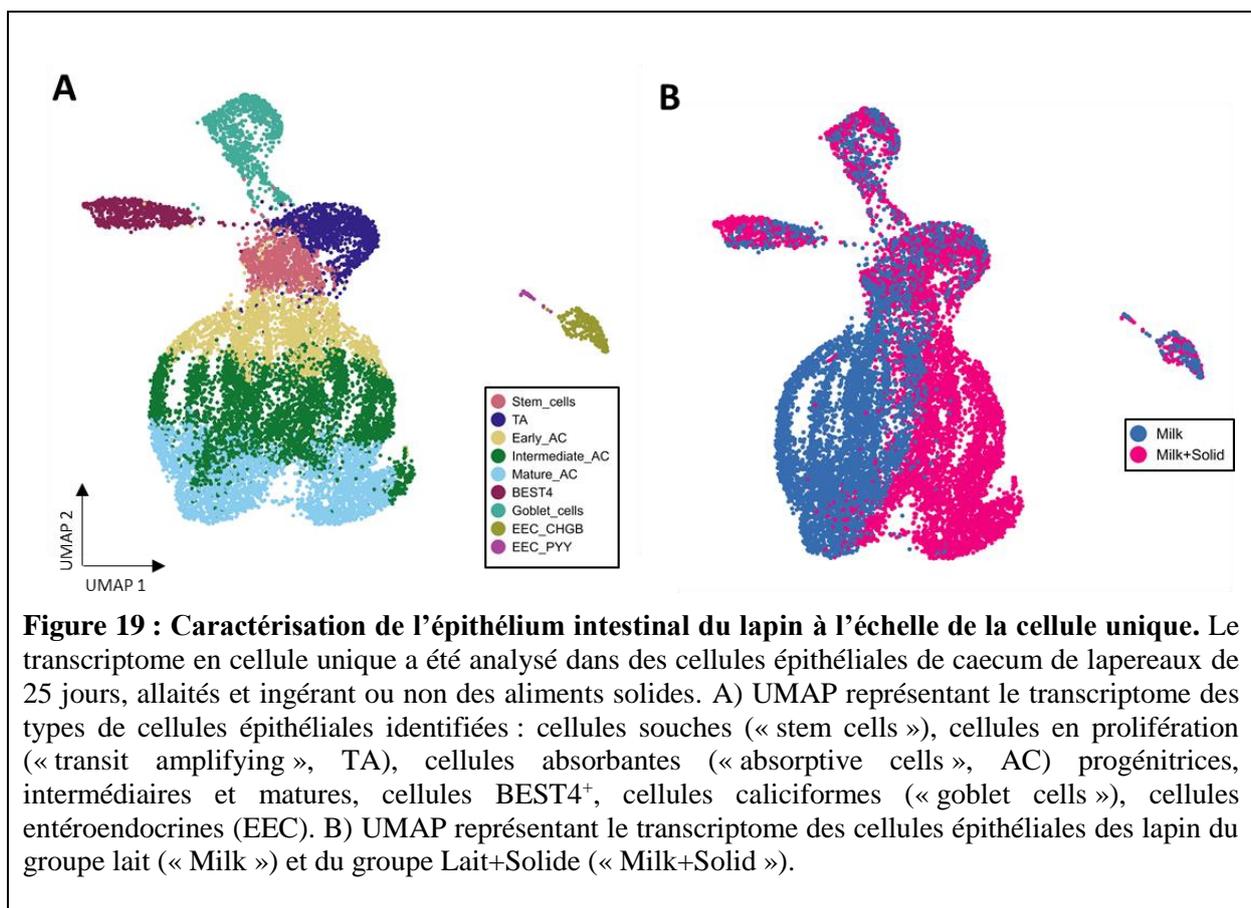
Figure 18 : Représentation schématique du projet de recherche. 1/ Etude à l'échelle de la cellule unique de la maturation de l'épithélium intestinal lors de l'introduction de l'alimentation solide. 2/ Etude des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'action des métabolites produits par le microbiote lors de l'introduction de l'alimentation solide sur les cellules épithéliales au moyen d'organoïdes intestinaux et d'intestins sur puce. 3/ Développement de stratégies nutritionnelles basées sur les métabolites produits par le microbiote lors de l'introduction de l'alimentation solide pour renforcer la santé digestive des jeunes animaux.

10.1 Compréhension à l'échelle de la cellule unique de la maturation de la barrière épithéliale intestinale lors de la transition alimentaire du sevrage

Actuellement, nous cherchons à **comprendre à l'échelle de la cellule unique quels sont les processus impliqués dans la maturation de l'épithélium intestinal lors de l'introduction de l'alimentation solide**. Ce travail est conduit dans le cadre du projet MetaboWean que je coordonne (2022-2025). Nous analysons le transcriptome en cellule unique de l'épithélium du caecum de lapereaux allaités âgés de 25 jours et ingérant ou non un aliment solide. L'analyse de ces données de « single cell RNA-sequencing » (scRNA-seq) est réalisée dans le cadre de la thèse de Tania Malonga (2022-2025) que je co-encadre avec Nathalie Vialaneix (Unité MIAT, INRAE, Toulouse), spécialisée dans l'analyse statistique de données omiques. Les résultats que nous avons obtenus ont permis de décrire pour la première fois la diversité cellulaire de l'épithélium du caecum du lapin chez lequel nous avons pu caractériser le transcriptome des cellules souches, des cellules en prolifération, des cellules absorbantes (progénitrices, intermédiaires et matures), des cellules caliciformes et deux types de cellules entéroendocrines distingués par leur profil d'expression d'hormones (Figure 19A). Nous n'avons pas observé certains types cellulaires rares décrits chez d'autres espèces (cellules de Paneth, cellules Tuft et cellules M) probablement en raison de difficultés de capture liée à leur faible abondance (<1%) et/ou de leur présence exclusive dans l'intestin grêle alors que nous avons caractérisé l'épithélium caecal.

De manière très intéressante, **nous avons identifié pour la première fois chez le lapin une sous-population de cellules absorbantes matures caractérisées par l'expression du gène codant pour le canal ionique Bestrophine 4 (BEST4)**, représentant environ 5% des cellules épithéliales dans notre jeu de données. Ces cellules BEST4⁺ ont récemment été décrites dans l'épithélium intestinal humain par

des approches de scRNA-seq et leur profil d'expression de gènes suggère leur implication dans la formation de la couche protectrice de mucus, les défenses antimicrobiennes, la sécrétion des ions et la régulation du pH luminal (Parikh et al., 2019; Elmentaite et al., 2021; Burclaff et al., 2022). Ces fonctions envisagées des cellules BEST4⁺ pourraient leur conférer un rôle important dans le dialogue entre le microbiote et son hôte. Cependant, ces hypothèses n'ont pas été validées expérimentalement en raison du manque de modèle animal dans la mesure où les cellules BEST4⁺ sont absentes chez la souris. La présence de ces cellules chez le lapin suggère qu'il pourrait s'agir d'un modèle animal approprié pour étudier leur rôle dans l'épithélium intestinal. De plus, nos données de qPCR indiquent que ces cellules BEST4⁺ pourraient également être présentes dans les organoïdes de caecum de lapin. Je trouve que ces cellules épithéliales nouvellement découvertes sont particulièrement intrigantes et je souhaiterais approfondir leur étude chez le lapin. A court terme, j'aimerais cartographier les cellules BEST4⁺ de l'épithélium du lapin dans les différents segments digestifs et dans l'axe crypto-villositaire ainsi qu'au cours du développement postnatal pour mieux comprendre leur physiologie, en lien avec la maturation du microbiote. J'envisage pour cela d'adapter la technologie d'hybridation *in situ* d'ARN (RNAscope) à l'intestin de lapin *in vivo* en *in vitro* (organoïdes). Ces premières données pourront servir de base à un projet plus vaste visant à **étudier le rôle des cellules épithéliales BEST4⁺ dans le dialogue avec le microbiote intestinal et ses métabolites au début de la vie**. Nous avons publié récemment un article de revue sur les cellules épithéliales intestinales BEST4⁺ afin de synthétiser les connaissances à leur sujet, indiquer leur présence chez le lapin et pour positionner les travaux de notre équipe sur ce thème de recherche (Malonga et al, 2024).



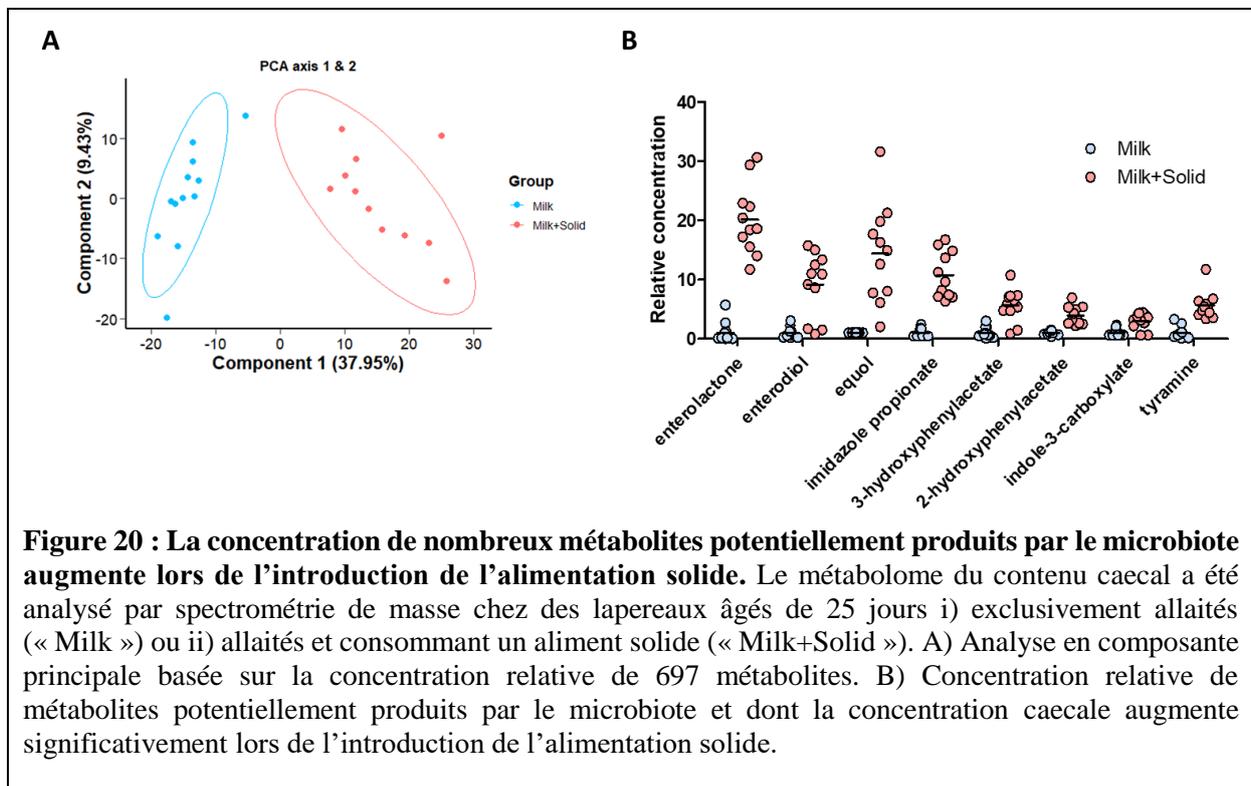
Nous avons observé que **l'effet de l'introduction de l'alimentation solide sur le transcriptome épithélial est particulièrement marqué dans les cellules absorbantes et dans les cellules BEST4⁺** (Figure 19B). Nos premiers résultats montrent en particulier que l'ingestion d'aliments solides module fortement l'expression de gènes impliqués dans les mécanismes de défense de l'épithélium (activation de la signalisation interféron de type I) et dans le métabolisme des lipides. Nous avons également

confirmé la plupart des modifications transcriptomiques que nous avons précédemment observées à l'échelle de cryptes épithéliales (Beaumont et al., 2022a) tout en identifiant quels types cellulaires sont impliqués dans ces changements d'expression de gènes. Les analyses en cours permettront de détailler dans chaque type de cellule épithéliale les fonctions biologiques dans lesquels sont impliqués les gènes dont l'expression est modifiée suite à l'introduction de l'alimentation solide. Ces données permettront de déterminer les processus en œuvre lors de la maturation de l'épithélium au moment de l'introduction de l'alimentation solide et pour lesquels nous chercherons ensuite à comprendre le rôle joué par les métabolites produits par le microbiote intestinal.

10.2 Etude des mécanismes d'action des métabolites bactériens contribuant à la maturation de l'épithélium intestinal au moyen d'organoïdes et d'intestins sur puce

10.2.1 Criblage des effets de métabolites bactériens sur l'épithélium intestinal et étude de leurs mécanismes d'action

Une approche de métabolomique par spectrométrie de masse nous a permis d'identifier plusieurs centaines de métabolites dont les concentrations sont modifiées dans le caecum des lapereaux allaités suite à l'introduction de l'alimentation solide (Figure 20A). Dans le cadre de la thèse de Julie Alberge (2024-2027) que je co-encadrerai avec Sylvie Combes (UMR GenPhySE, INRAE, Toulouse), nous chercherons parmi ces métabolites ceux dont l'origine bactérienne est connue pour les tester sur le modèle des monocouches de cellules d'organoïdes de caecum de lapin que nous avons développé précédemment (Mussard et al., 2020). Nous identifierons leurs effets sur la fonction de barrière de l'épithélium intestinal en utilisant des analyses fonctionnelles (TEER, mesure de perméabilité), des approches de biologie moléculaire et d'imagerie. Une première exploration de notre jeu de données suggère qu'il serait par exemple intéressant de tester les effets des métabolites suivants dont la concentration augmente suite à l'introduction de l'alimentation solide : imidazole propionate, 3-hydroxyphenylacétate, 2-hydroxyphenylacétate, 3-phenylpropionates, indole-3-carboxylate, tyramine, entérolactone, entérodiol, equol (Figure 20B).

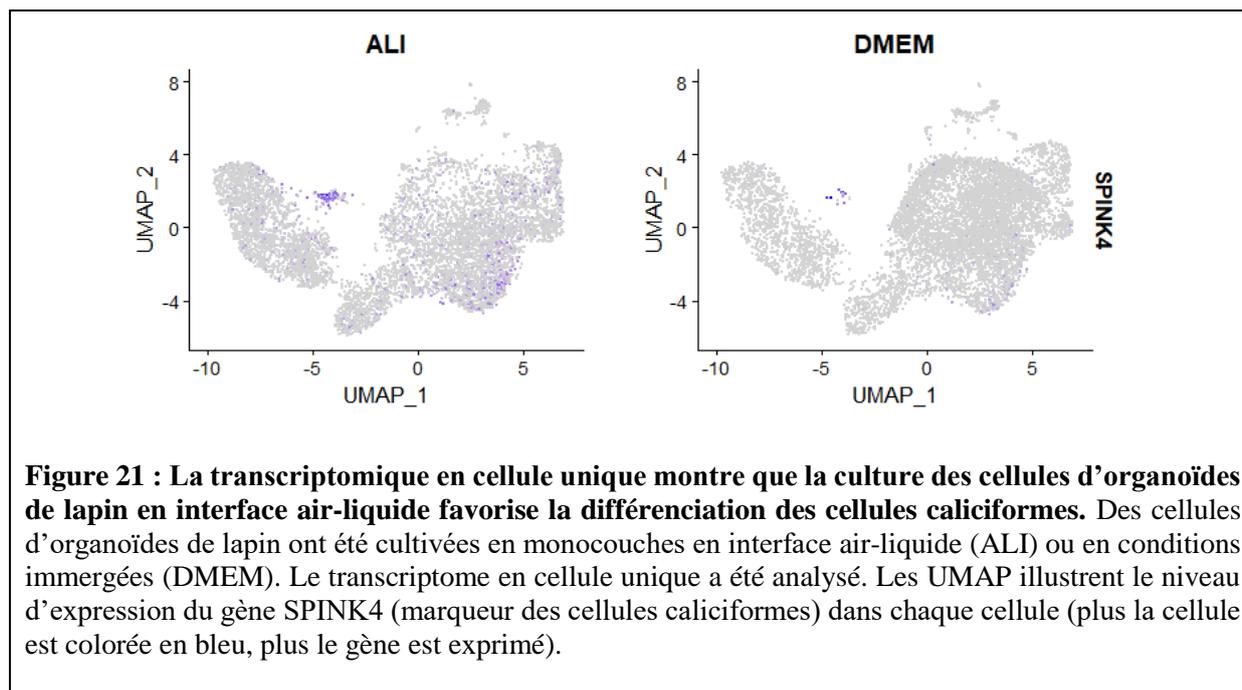


Lors de ce travail de thèse, nous prévoyons d'étudier ensuite en détail les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets des métabolites bactériens dont nous aurons documenté la capacité à renforcer la fonction de barrière de l'épithélium intestinal. Pour cela, nous souhaitons utiliser une approche de criblage en présence d'inhibiteurs pharmacologiques ciblant divers modes d'action possibles (Ghosh et al., 2021) tels que i) l'activation de récepteurs ou facteurs de transcription exprimés par les cellules épithéliales (ex. récepteurs de motifs moléculaires microbiens, récepteurs couplés à la protéine G, AhR, PXR, PPAR γ , mTOR) ii) des transporteurs ou enzymes des mitochondries et iii) des enzymes responsables de modifications épigénétiques (DNA-méthyltransférases, histone désacétylases). Pour étudier comment la composition cellulaire de l'épithélium module les effets des métabolites, ils seront également testés dans des conditions de culture permettant d'induire la différenciation épithéliale (en réduisant la concentration des facteurs mimant la niche des cellules souches ou en cultivant les cellules en interface air-liquide) ou en orientant la différenciation vers les lignages absorbants ou sécrétoires (ex : traitement par le DAPT, un inhibiteur de la voie Notch).

Les mécanismes testés seront adaptés en fonction des données de la littérature existante concernant les métabolites choisis. Selon les résultats obtenus, nous pourrions également explorer si les effets de ces métabolites sur la barrière épithéliale impliquent des modifications épigénétiques (modifications post-traductionnelles d'histones, méthylation de l'ADN) en poursuivant la collaboration avec Guillaume Devailly (UMR GenPhySE, INRAE, Toulouse), spécialiste de ce domaine. Il serait également possible de s'appuyer sur son expertise en édition du génome appliquée aux organoïdes intestinaux pour créer des lignées d'organoïdes d'intestin de lapin invalidés pour l'expression d'un gène d'intérêt (ex : récepteur présumé d'un métabolite). Nous utiliserons aussi une approche de transcriptomique en cellule unique pour caractériser de manière non ciblée les effets de certains métabolites bactériens produits lors de l'introduction de l'alimentation solide sur l'expression de gènes dans chaque type cellulaire présent dans les organoïdes. **L'utilisation combinée du modèle des monocouches de cellules d'organoïdes intestinaux avec les approches de transcriptomique en cellule unique devrait nous permettre de fortement progresser dans la compréhension des modes d'action cellulaires et moléculaires des métabolites produits par le microbiote lors de l'introduction de l'alimentation solide.** Les métabolites bactériens les plus prometteurs seront alors administrés par voie orale (gavage) à des lapereaux allaités afin d'étudier les conséquences pour le développement de la fonction de barrière de l'épithélium intestinal. Au-delà des nouvelles connaissances apportées sur le rôle du microbiote dans la maturation épithéliale, cette étape de validation *in vivo* des résultats obtenus sur les organoïdes permettra de conforter l'intérêt de ces nouveaux modèles d'étude de l'épithélium intestinal.

10.2.2 Complexification des systèmes de culture d'organoïdes intestinaux pour étudier l'action de métabolites bactériens

Pour étudier les effets des métabolites bactériens de manière spécifique à chaque type cellulaire de l'épithélium intestinal, il sera nécessaire de poursuivre l'amélioration des conditions de culture des organoïdes dans le but d'obtenir une population cellulaire la plus proche possible de celle observée dans l'épithélium *in vivo*. Je souhaite pour cela que nous utilisions la transcriptomique en cellule unique pour comparer les populations cellulaires (diversité, proportion, profil d'expression de gènes) présentes *in vivo* et *in vitro* dans les organoïdes. Nous avons initié des premières expériences dans le cadre de la thèse de Tania Malonga (2022-2025, projet ANR MetaboWean) pour définir quels types cellulaires sont présents dans les monocouches de cellules d'organoïdes de caecum de lapin en fonction des conditions de culture (immergée ou en interface air-liquide), choisies pour moduler le niveau de différenciation (Han et al., 2021; Sabapaty et al., 2024). Nos résultats préliminaires suggèrent par exemple que les cellules caliciformes productrices de mucus sont nettement plus abondantes en condition d'interface air-liquide (Figure 21). **Cette approche en cellule unique pourra nous guider dans l'optimisation des conditions de culture des organoïdes pour obtenir le phénotype souhaité en termes de populations cellulaires.** Ces données pourront notamment nous aider à déterminer les concentrations idéales de régulateurs des principales voies de signalisations contrôlant la prolifération et la différenciation épithéliale (Wnt, BMP, Notch, EGF).



Nous avons mis en place au laboratoire la culture des cellules d'organoïdes intestinaux de lapin et de porc sous forme de monocouches afin d'étudier les effets de métabolites bactériens au niveau du pôle apical (Mussard et al., 2020, 2023). Cependant, l'architecture 3D de l'épithélium n'est pas reproduite dans ces conditions alors qu'il a été montré que l'exposition des cellules épithéliales aux métabolites bactériens dépend de leur position dans la crypte (Kaiko et al., 2016). De plus, les métabolites bactériens sont produits de manière dynamique par le microbiote et leur accumulation est limitée *in vivo* par le transit intestinal et par leur absorption par l'épithélium avant d'être distribués à l'organisme. Or dans nos conditions, les métabolites sont administrés de manière statique et ne peuvent pas être éliminés après absorption par l'épithélium, ce qui modifie fortement l'exposition des cellules épithéliales aux métabolites par rapport à la situation *in vivo*. Pour contourner ces limites, **je propose d'utiliser la technologie des intestins sur puce pour complexifier nos systèmes de culture *in vitro* de l'épithélium intestinal du porc et du lapin dans le but d'améliorer leur pertinence physiologique pour étudier les interactions avec les métabolites produits par le microbiote au début de la vie.**

Les intestins sur puce (Gut-on-Chip) sont des systèmes microphysiologiques basés sur les avancées récentes dans les techniques de microfabrication et de microfluidique (Antfolk and Jensen, 2020; Ashammakhi et al., 2020). Il s'agit de systèmes généralement composés d'une membrane poreuse sur laquelle sont cultivées les cellules épithéliales et séparant deux microcanaux représentant le compartiment luminal (pôle apical) et sanguin (pôle basal) dans lesquels sont perfusés des milieux de culture distincts à un débit mimant l'écoulement dynamique de fluides observé *in vivo*. L'organisation en 3D de l'épithélium peut être reproduite dans ces systèmes grâce i) à la circulation de fluides provoquant des forces de cisaillement ou ii) par l'application de déformations mécaniques mimant le péristaltisme ou iii) par l'emploi de supports microstructurés reproduisant l'architecture épithéliale (Nikolaev et al., 2020). La reproduction de ce microenvironnement permet d'améliorer largement la pertinence physiologique de l'épithélium cultivé *in vitro*, notamment en augmentant son niveau de différenciation et en reproduisant la distribution des types cellulaires dans l'axe de la crypte. Les intestins sur puce les plus perfectionnés permettent également de co-cultiver les cellules épithéliales issues d'organoïdes intestinaux avec des cellules immunitaires ou avec un microbiote intestinal complexe anaérobie (Jalili-Firoozinezhad et al., 2019; Nikolaev et al., 2020). L'organisation spatiale et le phénotype des cellules cultivées sur les intestins sur puce peuvent être caractérisés par des approches d'imagerie et par l'analyse des effluents (métabolites, cytokines) ou grâce à l'utilisation de capteurs intégrés aux microsystèmes et permettant de mesurer en temps réel des paramètres tels que la TEER ou la concentration en oxygène. Le développement des modèles d'intestins sur puce est très dynamique et

d'importantes avancées sont attendues dans les années à venir avec notamment une amélioration de la standardisation des systèmes et de leur reproductibilité. La plupart des publications du domaine ont présenté des avancées méthodologiques et des preuves de concept (ex : co-culture avec un microbiote complexe) mais encore relativement peu de travaux avec des intestins sur puce ont été entrepris pour répondre à des questions biologiques. Enfin, les modèles d'intestin sur puce n'ont pas encore été adaptés aux espèces non modèles et aux animaux d'élevage.

Le développement de modèles d'intestins sur puce de porc ou de lapin nécessitera la mise en place de collaborations avec des laboratoires maîtrisant la culture des intestins sur puce humains. Ce partenariat pourrait être développé localement à Toulouse avec des laboratoires spécialisés en microfabrication et en microfluidique (LAAS, CNRS) et dans le développement d'intestins sur puce humains (IRSD, INSERM). Nous pourrions concevoir des puces microfluidiques mimant l'architecture de l'épithélium intestinal du porc ou du lapin que nous pourrions ensuite ensemercer avec des cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de ces espèces. Une fois le modèle mis au point, nous pourrions alors perfuser des métabolites bactériens d'intérêt dans la chambre apicale de ces intestins sur puce pour évaluer leurs effets sur la barrière épithéliale en utilisant des approches d'imagerie et de biologie moléculaire (Figure 22A et B). L'exposition aux métabolites bactériens sous forme de flux dynamique semble particulièrement pertinente pour mimer leur production continue par les bactéries dans l'intestin, leur absorption par l'épithélium et leur élimination par la circulation sanguine.

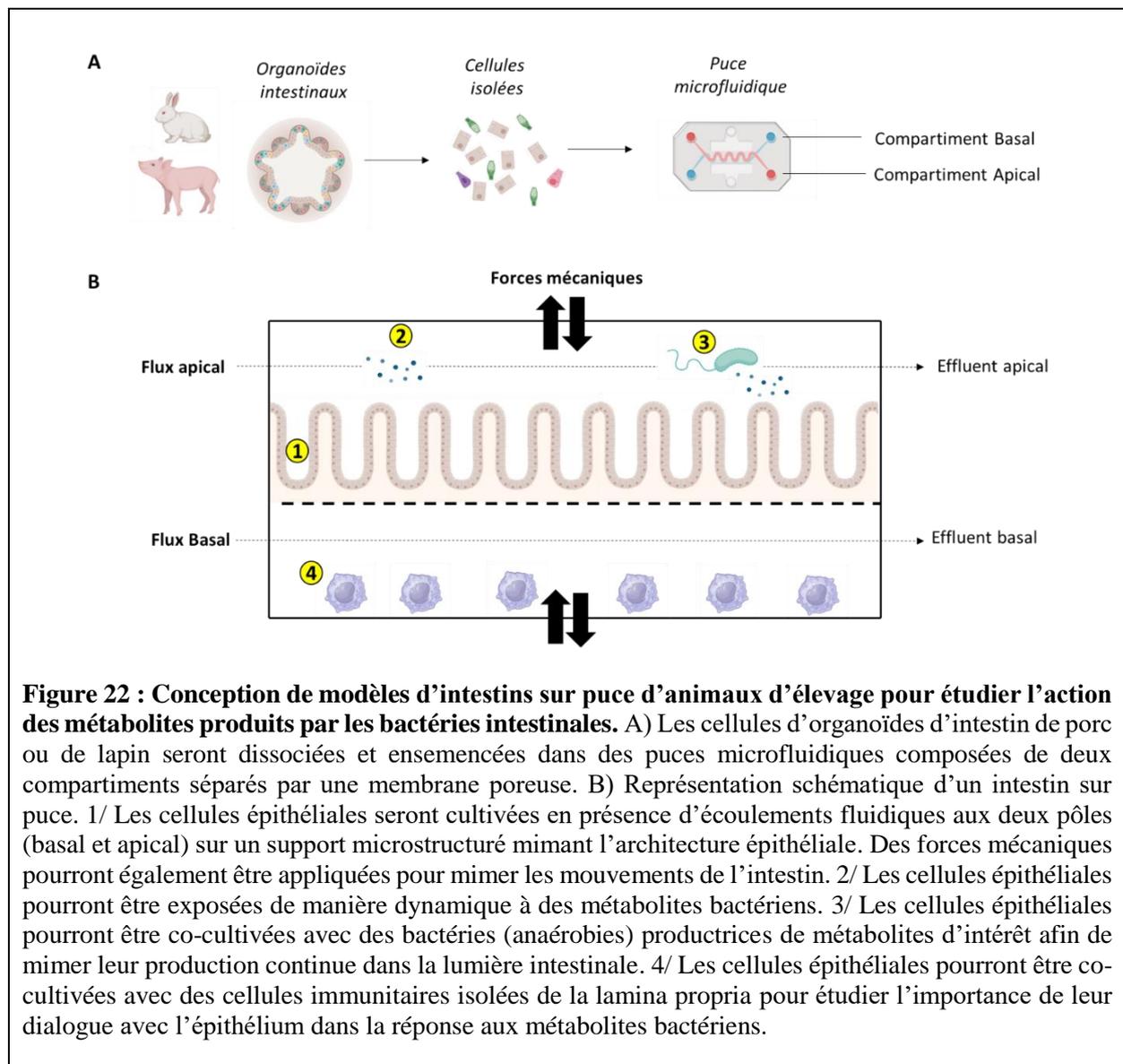


Figure 22 : Conception de modèles d'intestins sur puce d'animaux d'élevage pour étudier l'action des métabolites produits par les bactéries intestinales. A) Les cellules d'organoïdes d'intestin de porc ou de lapin seront dissociées etensemencées dans des puces microfluidiques composées de deux compartiments séparés par une membrane poreuse. B) Représentation schématique d'un intestin sur puce. 1/ Les cellules épithéliales seront cultivées en présence d'écoulements fluidiques aux deux pôles (basal et apical) sur un support microstructuré mimant l'architecture épithéliale. Des forces mécaniques pourront également être appliquées pour mimer les mouvements de l'intestin. 2/ Les cellules épithéliales pourront être exposées de manière dynamique à des métabolites bactériens. 3/ Les cellules épithéliales pourront être co-cultivées avec des bactéries (anaérobies) productrices de métabolites d'intérêt afin de mimer leur production continue dans la lumière intestinale. 4/ Les cellules épithéliales pourront être co-cultivées avec des cellules immunitaires isolées de la lamina propria pour étudier l'importance de leur dialogue avec l'épithélium dans la réponse aux métabolites bactériens.

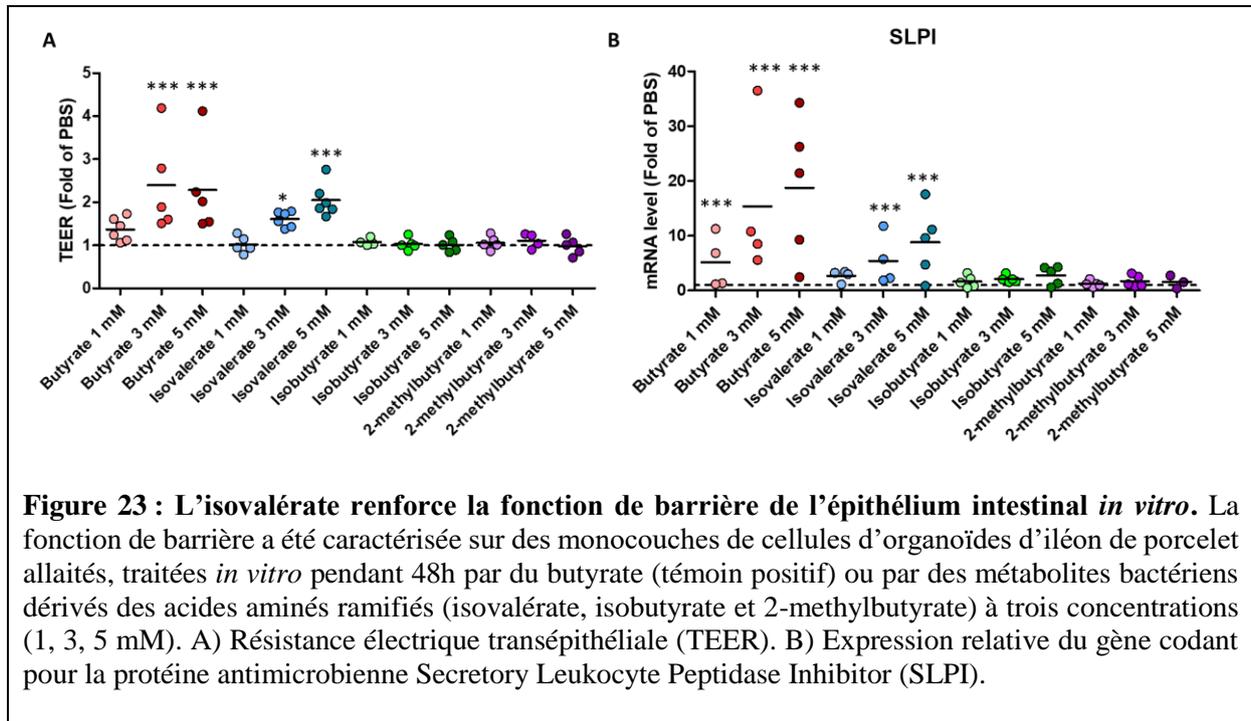
Dans un second temps, nous pourrions développer les systèmes de co-culture des cellules épithéliales intestinales issues d'organoïdes avec des cellules immunitaires isolées de la *lamina propria* (collaboration avec Christelle Knudsen, GenPhySE, INRAE, Toulouse) et ii) des bactéries du microbiote intestinal, idéalement en condition anaérobie (collaboration avec Claudia Vicente, GenPhySE, INRAE, Toulouse). Appliqué à nos projets de recherche centrés sur le rôle des métabolites produits par le microbiote au début de la vie, ces systèmes nous permettront à la fois de prendre en compte le dialogue entre les cellules épithéliales et immunitaires dans la réponse aux métabolites mais pourront aussi nous permettre de modéliser la production *in situ* des métabolites par les bactéries situées dans le compartiment luminal (Figure 22B). Nous pourrions également tester les effets de souches de bactéries génétiquement modifiées pour altérer leur capacité de production d'un métabolite d'intérêt de manière à déterminer les conséquences pour la fonction de barrière de l'épithélium, comme effectué précédemment sur des modèles d'intestin sur puce humains (Hayes et al., 2023). Cette approche permettrait de dissocier l'effet de la production du métabolite de celui de la présence de la bactérie qui pourrait agir sur l'épithélium par de nombreux autres mécanismes tels que la stimulation de récepteurs de surface (ex : Toll-like receptors).

Le développement des intestins sur puce d'animaux d'élevage demandera des moyens financiers importants notamment pour l'acquisition des systèmes de contrôle de la microfluidique. Nous avons effectué une première demande de financement infructueuse auprès des instituts Carnot France Futur Elevage et Qualiment en collaboration avec Claire Cherbuy (MICALIS, INRAE, Jouy-en-Josas) et Sonia Lacroix-Lamandé (ISP, INRAE, Nouzilly) pour développer conjointement des intestins sur puce de porc, de veau et humain cultivés respectivement avec des métabolites bactériens, des parasites ou un microbiote complexe. D'autres demandes de financement pourront être effectuées, notamment en partenariat avec les membres du groupe de travail INRAE sur les organoïdes. **Combiné à notre maîtrise des cultures d'organoïdes d'intestinaux et des techniques de transcriptomique en cellule unique, l'utilisation des systèmes d'intestin sur puce nous permettra de disposer des technologies les plus avancées pour étudier l'action du microbiote intestinal sur le développement de la barrière épithéliale au début de la vie.** De plus, cette approche est originale dans la mesure où elle n'a pas encore été développée chez les animaux d'élevage et les perspectives d'applications en santé vétérinaire sont très nombreuses (test de produits bioactifs, de médicaments, etc.). La pertinence physiologique accrue des modèles d'intestins sur puces contribuera à poursuivre la réduction de l'expérimentation sur les animaux vivants initiée par l'utilisation des organoïdes.

10.3 Développement d'innovations nutritionnelles visant à renforcer la barrière intestinale en ciblant les métabolites produits par le microbiote

Il est désormais clairement établi que certains métabolites bactériens (ex : acides gras à chaînes courtes ou dérivés indoliques) contribuent largement aux effets protecteurs du microbiote sur la barrière intestinale (Ghosh et al., 2021). Pourtant, relativement peu de stratégies préventives ou thérapeutiques ciblant les métabolites du microbiote ont été développées dans les domaines de la santé humaine ou vétérinaire. Le principal exemple est l'utilisation du butyrate dans l'alimentation animale pour favoriser la croissance et la santé digestive, ou son administration chez l'homme dans le cadre du traitement des maladies inflammatoires intestinales, bien que l'efficacité de cette pratique reste discutée (Bedford and Gong, 2018). Cette approche pourrait être étendue à d'autres métabolites produits par le microbiote en s'appuyant sur les progrès récents concernant la caractérisation de leurs effets sur les cellules animales. **A moyen terme, je propose d'utiliser les connaissances produites par notre équipe sur les métabolites bactériens pour développer des produits nutritionnels renforçant la barrière intestinale au début de la vie.** Cette démarche est illustrée ici avec l'exemple de l'isovalérate, un métabolite produit par le microbiote à partir de l'acide aminé leucine, dont nous avons montré récemment les effets protecteurs pour la fonction de barrière de l'épithélium intestinal dans le cadre d'un partenariat avec l'entreprise METEX (fabricant d'acides aminés pour l'alimentation animale) (Figure 23A et B). Nos résultats montrent que le traitement de monocouches de cellules d'organoïdes d'iléon de porcelet par de l'isovalérate augmente la TEER de manière dose dépendante et module l'expression de gènes impliqués dans les défenses épithéliales (ex : SLPI, CXCL8, GPX1). Ces résultats sont cohérents avec des données récentes de la littérature montrant que l'isovalérate joue un rôle

immunomodulateur dans l'intestin chez le poulet et la souris (Guo et al., 2019; Wang et al., 2023b). L'isovalérate semble donc être un métabolite prometteur pour être ciblé dans le cadre d'une approche nutritionnelle visant à renforcer la santé intestinale.

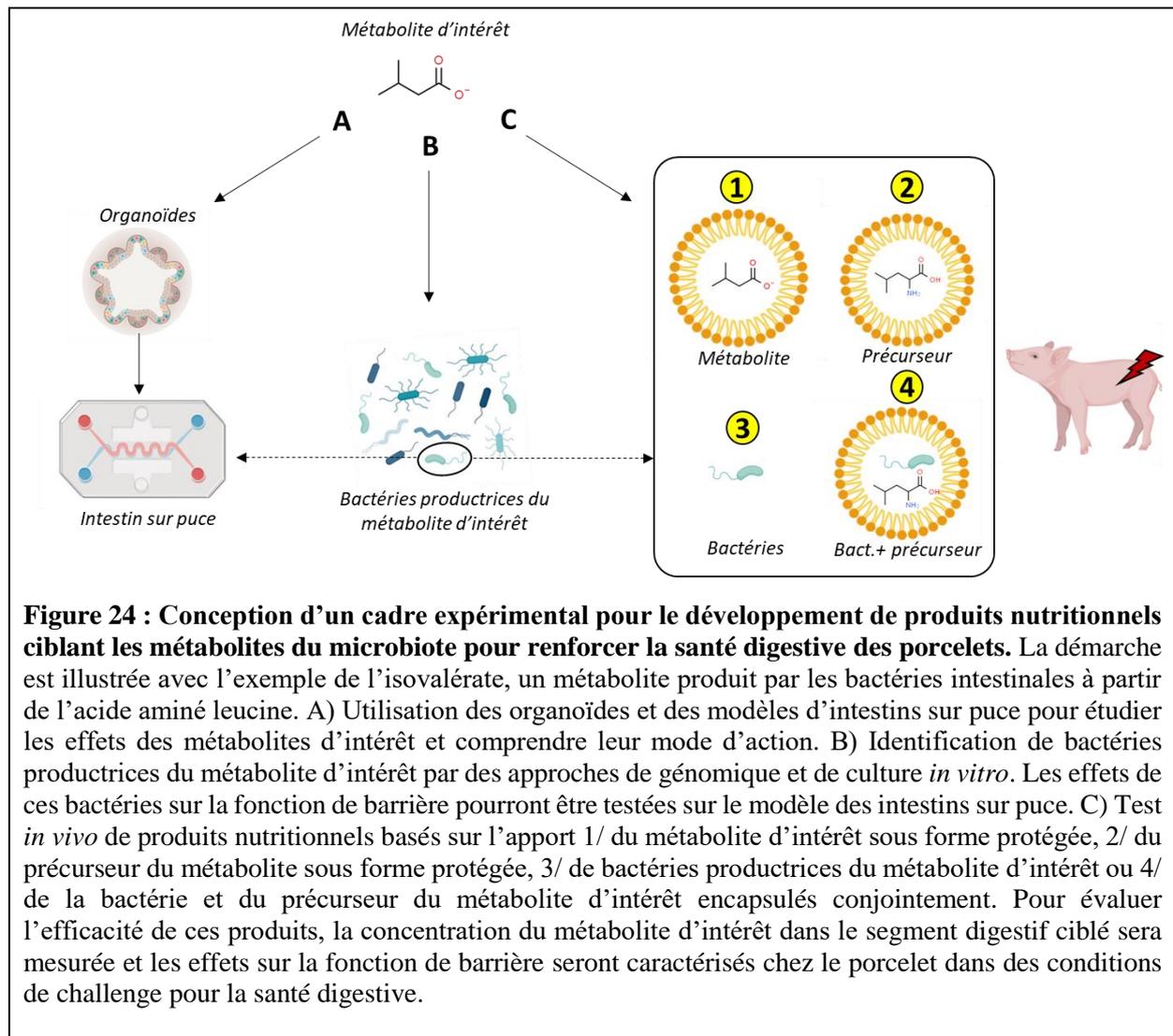


Le moyen le plus direct pour utiliser les métabolites bactériens afin d'apporter un bénéfice à la santé consiste à les inclure dans l'alimentation ou dans l'eau de boisson. Il a par exemple été montré que l'administration orale de métabolites bactériens tels que l'urolithine A, l'indole ou le butyrate permet de renforcer la fonction barrière de l'intestin chez la souris (Whitfield-Cargile et al., 2016; Zhao et al., 2018; Singh et al., 2019). Ces résultats peuvent sembler surprenants dans la mesure où ces métabolites administrés sous forme libre et par voie orale sont théoriquement absorbés très rapidement par l'estomac ou le duodénum. Cependant, il est possible que le temps de transit dans l'intestin de métabolites administrés dans une solution liquide soit bref, en particulier chez des animaux à jeun, ce qui permettrait à l'ensemble du tractus digestif d'être exposé. Les effets protecteurs des métabolites administrés par voie orale pourraient également résulter d'une action systémique, par exemple via le système immunitaire. Différentes techniques peuvent être mises en œuvre pour favoriser la libération distale des métabolites administrés oralement. Par exemple, le butyrate apporté sous forme d'ester de glycérol (tributyrate) ou protégé dans des micelles peut échapper à l'absorption dans l'intestin proximal jusqu'à être libéré suite à l'action des lipases pancréatiques (Bedford and Gong, 2018; Wang et al., 2023a). Cette démarche semble facilement extrapolable au cas de l'isovalérate dont la structure chimique est très proche du butyrate. Nous pourrions par exemple **développer des formes protégées d'isovalérate** en partenariat avec un laboratoire académique (ex : BIA, INRAE, Nantes) ou avec une entreprise de l'alimentation animale spécialisée dans l'encapsulation de nutriments afin d'étudier chez des porcelets les conséquences pour sa cinétique de libération dans le tractus digestif ainsi que ses effets sur la fonction de barrière de l'intestin. Les conséquences de cette supplémentation en isovalérate encapsulé sur la fonction de barrière de l'intestin pourraient être testées par exemple chez des porcelets infectés par un pathogène entérique (collaboration possible avec PFIE, INRAE, Tours) ou exposés à une mycotoxine (collaboration possible avec TOXALIM, INRAE, Toulouse).

Il serait également envisageable de mettre en place **une approche prébiotique basée sur l'apport de substrats nécessaires pour la production du métabolite d'intérêt par les bactéries du microbiote dotées de cette capacité métabolique**. Dans le cas de l'isovalérate, il s'agirait de compléter l'alimentation en leucine sous une forme protégée pour permettre son acheminement jusqu'au site distal

de colonisation par le microbiote. Cette démarche appliquée aux acides aminés correspond au concept d'« aminobiotiques » présenté ci-dessus (Beaumont et al., 2022b). La mise en place de ce type d'approche pourra être menée en partenariat avec des entreprises de l'alimentation animale. Il serait également intéressant de tester **une approche probiotique reposant sur l'administration de bactéries capables de produire le métabolite d'intérêt**. Cette stratégie pourrait être mise en place dans le cadre d'un travail collaboratif au sein de mon équipe avec mes collègues spécialisés en bioinformatique et en microbiologie. La sélection des bactéries candidates pourrait se faire dans un premier temps par une approche *in silico* visant à rechercher dans le génome de bactéries intestinales isolées ou dans des métagénomes la présence de « cluster de gènes métaboliques » dont l'implication dans la production du métabolite d'intérêt est connue. Dans le cas de l'isovalérate, nous pourrions rechercher l'ensemble des bactéries dont le génome possède le gène *PorA*, celui-ci ayant été montré nécessaire à la synthèse d'isovalérate par le microorganisme commensal modèle *Clostridium sporogenes* (Guo et al., 2019). Les bactéries candidates connues pour coloniser l'intestin de l'espèce d'intérêt (porc ou lapin) pourront être obtenues auprès de collections si disponibles ou pourront être isolées à partir d'échantillons de microbiote intestinal, en collaboration avec les microbiologistes de mon équipe. La capacité de ces bactéries à produire de l'isovalérate *in vitro* en présence de leucine pourra être vérifiée par métabolomique RMN. Ces bactéries pourront alors être testées pour leur effet sur la fonction de barrière dans le modèle des organoïdes et/ou des intestins sur puce avant de valider leur bénéfice pour la santé digestive *in vivo*. La co-administration (sous forme protégée) de ce type de probiotiques avec le substrat nécessaire à la production du métabolite d'intérêt pourrait être une approche prometteuse, correspondant au concept de symbiotique. Pour l'isovalérate, il s'agirait d'apporter conjointement de la leucine avec une bactérie capable de produire ce métabolite. Une approche alternative consisterait à introduire les gènes impliqués dans la production de métabolites d'intérêt dans le génome de bactéries modèles simples à cultiver *in vitro*. Cependant, cette approche OGM ne semble pas appropriée pour une utilisation en alimentation animale, pour des raisons environnementales et d'acceptation sociétale. Bien que le développement de nouveaux probiotiques sélectionnés sur leur capacité à produire des métabolites d'intérêt semble prometteur, de nombreux obstacles pourraient s'opposer à leur utilisation en alimentation (absence de colonisation de l'intestin, conditions défavorables *in vivo* pour produire le métabolite d'intérêt en condition suffisante pour observer un effet biologique, etc.). Néanmoins, l'identification et la culture de bactéries capables de produire *in vitro* les métabolites d'intérêt permettraient de disposer d'une source naturelle de ces composés bactériens dont les formes disponibles commercialement sont généralement issues de synthèse chimique ou de microorganismes OGM. La disponibilité des métabolites bactériens d'origine naturelle pourrait faciliter leur utilisation dans l'alimentation animale.

Les perspectives d'utilisation des métabolites bactériens en alimentation animale ouvrent de nombreuses possibilités de partenariat avec les entreprises du secteur. A moyen terme, nous pourrions proposer dans notre équipe **un cadre expérimental pour la conduite de projets de recherche partenariale visant à développer des produits nutritionnels innovants basés sur les métabolites produits par le microbiote intestinal** (Figure 24). Il s'agirait de mettre en place de manière coordonnée les outils nécessaires pour 1/ caractériser les effets de métabolites d'intérêt sur la barrière intestinale et comprendre leur mode d'action dans le modèle des intestins sur puce, 2/ identifier et cultiver des bactéries capables de produire les métabolites ciblés et 3/ développer des produits nutritionnels permettant de renforcer la santé intestinale grâce aux métabolites ciblés. L'exemple de l'isovalérate pourrait être utilisé pour calibrer cette démarche expérimentale chez le porc.



11. CONCLUSION

Depuis le début des années 2000, de nombreuses études ont montré le rôle crucial du microbiote intestinal pour le développement et la santé de son hôte animal. Cependant, relativement peu d'innovations thérapeutiques ou préventives efficaces ont été issues de ces travaux, probablement en raison de la complexité de cet écosystème microbien et du manque de connaissances sur les mécanismes impliqués dans l'action du microbiote sur son hôte. C'est dans ce contexte que, depuis 2013, mes activités de recherche ont été principalement consacrées à étudier les effets des métabolites produits par le microbiote intestinal sur le fonctionnement des cellules de l'appareil digestif. Je me suis intéressé à divers métabolites bactériens tels que le butyrate, l'isovalérate, la triméthylamine, l'indole, le sulfure d'hydrogène et le *p*-cresol. Les résultats obtenus ont contribué à montrer l'importance de ces petites molécules en tant qu'intermédiaires moléculaires entre le microbiote et les cellules épithéliales intestinales ou hépatiques. Cependant, les progrès dans les techniques de métabolomique révèlent que la diversité des métabolites produits par le microbiote intestinal est immense et les effets de la plupart d'entre eux ne sont pas connus, tout comme leurs modes d'action. Ce champ de recherche est donc encore largement ouvert et presque tout reste à faire pour transformer ces connaissances sur les métabolites bactériens en innovations pour préserver la santé. C'est donc avec enthousiasme que j'envisage de poursuivre ma carrière sur cette thématique avec l'objectif d'aller plus loin dans l'étude des mécanismes d'action cellulaires et moléculaires des métabolites bactériens sur l'épithélium intestinal.

Bien que l'ensemble de mes travaux aient été centrés sur les effets des métabolites bactériens sur les cellules animales, mon recrutement à INRAE a représenté un tournant dans la mesure où la finalité de ces recherches a évolué de la santé humaine à la santé vétérinaire. Mes craintes initiales liées à ce changement de contexte se sont révélées infondées. En effet, je n'ai pas rencontré de difficultés particulières pour financer ces travaux non directement appliqués à la recherche biomédicale, ni pour publier les résultats obtenus. Au contraire, ces travaux menés sur des espèces domestiques (porc et lapin) sont originaux, ce qui suscite de la curiosité de l'extérieur et limite la compétition avec d'autres laboratoires. Notre identification récente des cellules épithéliales intestinales BEST4⁺ chez le lapin (présentes chez l'homme mais absentes chez la souris) est une illustration de l'intérêt de l'utilisation de divers modèles animaux pour étudier la physiologie digestive. De plus, les recherches menées chez ces animaux peuvent avoir une double portée : en science fondamentale et en science appliquée pour l'élevage. Il faut tout de même reconnaître certaines difficultés techniques liées au manque d'outils disponible chez ces espèces, en particulier chez le lapin (ex : mauvaise qualité d'annotation du génome et faible disponibilité d'anticorps validés). Par ailleurs, j'ai pu maintenir mon réseau de collaboration avec des scientifiques de la recherche biomédicale tout en développant de nouveaux liens avec des chercheurs spécialistes des animaux d'élevage. Cette diversité de points de vue est particulièrement enrichissante. Enfin, bien que relativement lointaines, les perspectives d'applications de nos travaux actuels pour réduire l'utilisation des antibiotiques en élevage répondent à un enjeu majeur de santé publique.

Mes travaux sur les métabolites bactériens ont été menés sur divers modèles *ex vivo* (explants de foie) et *in vitro* (lignées cellulaires et organoïdes). Le premier intérêt de ces approches est de pouvoir démontrer des relations de cause à effet dans un système simplifié permettant d'éviter les interactions non contrôlées avec certains types cellulaires ou facteurs environnementaux. Le second intérêt de ces modèles est de permettre la réduction de l'expérimentation animale, ce qui répond à une exigence sociétale grandissante. Il faut cependant noter que ces modèles *ex vivo/in vitro* i) nécessitent toujours l'utilisation de produits animaux (ex. sérum de veau fœtal et Matrigel) et ii) présentent d'importantes limites liées à leur viabilité (modèles *ex vivo*) ou à leur manque de complexité et à leur isolement du reste de l'organisme. Le développement récent des systèmes microphysiologiques auquel je souhaite contribuer en mettant en place des intestins sur puce d'animaux d'élevage pourrait améliorer la pertinence physiologique de ces modèles *in vitro*. Néanmoins, la validation *in vivo* des résultats obtenus restera toujours nécessaire dans la mesure où aucun modèle ne pourra refléter toute la complexité des animaux pour lesquels ces recherches ont vocation à être appliquées.

Le but de mon recrutement en 2018 était de mettre en place dans mon équipe un nouvel axe de recherche centré sur la biologie de l'épithélium intestinal. J'adresse donc mes questionnements sur ce thème principalement à des collaborateurs en dehors de mon équipe/unité. En revanche, mon environnement local est très favorable à l'acquisition et au traitement bio-informatique et statistique de données omiques variées (métagénomique, transcriptomique, épigénomique, métabolomique). Ce contexte facilite grandement l'utilisation de technologies de pointes (séquençage longues lectures, en cellules uniques, etc.). De plus, les disciplines traitées par mon équipe en écologie microbienne, microbiologie et immunologie complètent de manière efficace mon domaine d'expertise. Mon environnement de travail actuel est donc tout à fait adéquat pour la conduite de mes travaux de recherche.

Enfin, je souhaite poursuivre mon implication dans l'encadrement d'étudiants et de personnels techniques dont la contribution à l'avancement de nos projets de recherche est cruciale. Je candidate donc à l'habilitation à diriger des recherches, alors que la première étudiante dont j'ai encadré la thèse, l'a soutenue avec succès. Ce diplôme sera nécessaire pour la suite de ma carrière afin de continuer à participer à la formation de doctorants et dans la perspective de passer le concours de directeur de recherche INRAE.

12. REFERENCES

- Agace, W. W., and McCoy, K. D. (2017). Regionalized Development and Maintenance of the Intestinal Adaptive Immune Landscape. *Immunity* 46, 532–548. doi: 10.1016/j.immuni.2017.04.004
- Al Nabhani, Z., and Eberl, G. (2020). Imprinting of the immune system by the microbiota early in life. *Mucosal Immunol* 13, 183–189. doi: 10.1038/s41385-020-0257-y
- Andriamihaja, M., Lan, A., Beaumont, M., Audebert, M., Wong, X., Yamada, K., et al. (2015). The deleterious metabolic and genotoxic effects of the bacterial metabolite p-cresol on colonic epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 85, 219–227. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.004
- Andriamihaja, M., Lan, A., Beaumont, M., Grauso, M., Gotteland, M., Pastene, E., et al. (2018). Proanthocyanidin-containing polyphenol extracts from fruits prevent the inhibitory effect of hydrogen sulfide on human colonocyte oxygen consumption. *Amino Acids* 50, 755–763. doi: 10.1007/s00726-018-2558-y
- Antfolk, M., and Jensen, K. B. (2020). A bioengineering perspective on modelling the intestinal epithelial physiology in vitro. *Nat Commun* 11, 6244. doi: 10.1038/s41467-020-20052-z
- Ashammakhi, N., Nasiri, R., Barros, N. R. de, Tebon, P., Thakor, J., Goudie, M., et al. (2020). Gut-on-a-chip: Current progress and future opportunities. *Biomaterials* 255, 120196. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120196
- Bansal, T., Alaniz, R. C., Wood, T. K., and Jayaraman, A. (2010). The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 228–233. doi: 10.1073/pnas.0906112107
- Barnett, A. M., Mullaney, J. A., Hendriks, C., Le Borgne, L., McNabb, W. C., and Roy, N. C. (2021). Porcine colonoids and enteroids keep the memory of their origin during regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol* 320, C794–C805. doi: 10.1152/ajpcell.00420.2020
- Beaumont, M., Andriamihaja, M., Armand, L., Grauso, M., Jaffrézic, F., Laloë, D., et al. (2017a). Epithelial response to a high-protein diet in rat colon. *BMC Genomics* 18, 116. doi: 10.1186/s12864-017-3514-z
- Beaumont, M., Andriamihaja, M., Lan, A., Khodorova, N., Audebert, M., Blouin, J.-M., et al. (2016). Detrimental effects for colonocytes of an increased exposure to luminal hydrogen sulfide: The adaptive response. *Free Radical Biology and Medicine* 93, 155–164. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.01.028
- Beaumont, M., Blanc, F., Cherbuy, C., Egidy, G., Giuffra, E., Lacroix-Lamandé, S., et al. (2021a). Intestinal organoids in farm animals. *Vet Res* 52, 33. doi: 10.1186/s13567-021-00909-x
- Beaumont, M., Cauquil, L., Bertide, A., Ahn, I., Barilly, C., Gil, L., et al. (2021b). Gut Microbiota-Derived Metabolite Signature in Suckling and Weaned Piglets. *J Proteome Res* 20, 982–994. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00745
- Beaumont, M., Jaoui, D., Douard, V., Mat, D., Koeth, F., Goustard, B., et al. (2017b). Structure of protein emulsion in food impacts intestinal microbiota, caecal luminal content composition and distal intestine characteristics in rats. *Mol Nutr Food Res* 61. doi: 10.1002/mnfr.201700078
- Beaumont, M., Lencina, C., Bertide, A., Gallo, L., Barilly, C., Marraud, C., et al. (2023a). The Early Life Microbiota Is Not a Major Factor Underlying the Susceptibility to Postweaning Diarrhea in Piglets. *Microbiol Spectr*, e0069423. doi: 10.1128/spectrum.00694-23
- Beaumont, M., Lencina, C., Fève, K., Barilly, C., Le-Normand, L., Combes, S., et al. (2023b). Disruption of the primocolonizing microbiota alters epithelial homeostasis and imprints stem cells in the colon of neonatal piglets. *The FASEB Journal* 37, e23149. doi: 10.1096/fj.202301182R
- Beaumont, M., Lencina, C., Panteaux, L., Viémond-Desplanque, J., Phornlaphat, O., Lambert, W., et al. (2021c). A mix of functional amino acids and grape polyphenols promotes the growth of piglets, modulates the gut microbiota in vivo and regulates epithelial homeostasis in intestinal organoids. *Amino Acids*. doi: 10.1007/s00726-021-03082-9
- Beaumont, M., Mussard, E., Barilly, C., Lencina, C., Gress, L., Panteaux, L., et al. (2022a). Developmental Stage, Solid Food Introduction, and Suckling Cessation Differentially Influence the Comaturation of the Gut Microbiota and Intestinal Epithelium in Rabbits. *J Nutr* 152, 723–736. doi: 10.1093/jn/nxab411

- Beaumont, M., Neyrinck, A. M., Olivares, M., Rodriguez, J., de Rocca Serra, A., Roumain, M., et al. (2018). The gut microbiota metabolite indole alleviates liver inflammation in mice. *The FASEB Journal* 32, 6681–6693. doi: 10.1096/fj.201800544
- Beaumont, M., Paës, C., Mussard, E., Knudsen, C., Cauquil, L., Aymard, P., et al. (2020). Gut microbiota derived metabolites contribute to intestinal barrier maturation at the suckling-to-weaning transition. *Gut Microbes* 11, 1268–1286. doi: 10.1080/19490976.2020.1747335
- Beaumont, M., Portune, K. J., Steuer, N., Lan, A., Cerrudo, V., Audebert, M., et al. (2017c). Quantity and source of dietary protein influence metabolite production by gut microbiota and rectal mucosa gene expression: a randomized, parallel, double-blind trial in overweight humans. *Am J Clin Nutr* 106, 1005–1019. doi: 10.3945/ajcn.117.158816
- Beaumont, M., Roura, E., Lambert, W., Turni, C., Michiels, J., and Chalvon-Demersay, T. (2022b). Selective nourishing of gut microbiota with amino acids: A novel prebiotic approach? *Front Nutr* 9, 1066898. doi: 10.3389/fnut.2022.1066898
- Bedford, A., and Gong, J. (2018). Implications of butyrate and its derivatives for gut health and animal production. *Animal Nutrition* 4, 151–159. doi: 10.1016/j.aninu.2017.08.010
- Blachier, F., Beaumont, M., and Kim, E. (2019). Cysteine-derived hydrogen sulfide and gut health: a matter of endogenous or bacterial origin. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 22, 68. doi: 10.1097/MCO.0000000000000526
- Blachier, F., Davila, A.-M., Mimoun, S., Benetti, P.-H., Atanasiu, C., Andriamihaja, M., et al. (2010). Luminal sulfide and large intestine mucosa: friend or foe? *Amino Acids* 39, 335–347. doi: 10.1007/s00726-009-0445-2
- Blachier, F., Mariotti, F., Huneau, J. F., and Tomé, D. (2007). Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino Acids* 33, 547–562. doi: 10.1007/s00726-006-0477-9
- Burclaff, J., Bliton, R. J., Breau, K. A., Ok, M. T., Gomez-Martinez, I., Ranek, J. S., et al. (2022). A Proximal-to-Distal Survey of Healthy Adult Human Small Intestine and Colon Epithelium by Single-Cell Transcriptomics. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 13, 1554–1589. doi: 10.1016/j.jcmgh.2022.02.007
- Chalvon-Demersay, T., Luise, D., Le Floc'h, N., Tesseraud, S., Lambert, W., Bosi, P., et al. (2021). Functional Amino Acids in Pigs and Chickens: Implication for Gut Health. *Front Vet Sci* 8, 663727. doi: 10.3389/fvets.2021.663727
- Davila, A.-M., Blachier, F., Gotteland, M., Andriamihaja, M., Benetti, P.-H., Sanz, Y., et al. (2013). Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host. *Pharmacological Research* 68, 95–107. doi: 10.1016/j.phrs.2012.11.005
- Day, L., Cakebread, J. A., and Loveday, S. M. (2022). Food proteins from animals and plants: Differences in the nutritional and functional properties. *Trends in Food Science & Technology* 119, 428–442. doi: 10.1016/j.tifs.2021.12.020
- Derricott, H., Luu, L., Fong, W. Y., Hartley, C. S., Johnston, L. J., Armstrong, S. D., et al. (2019). Developing a 3D intestinal epithelium model for livestock species. *Cell Tissue Res.* 375, 409–424. doi: 10.1007/s00441-018-2924-9
- Devailly, G., Feve, K., Saci, S., Sarry, J., Valière, S., Lluch, J., et al. (2024). Divergent selection for feed efficiency in pigs altered the duodenum transcriptomic response to feed intake and its DNA methylation profiles. *Physiol Genomics*. doi: 10.1152/physiolgenomics.00123.2023
- Dou, S., Gadonna-Widehem, P., Rome, V., Hamoudi, D., Rhazi, L., Lakhali, L., et al. (2017). Characterisation of Early-Life Fecal Microbiota in Susceptible and Healthy Pigs to Post-Weaning Diarrhoea. *PLOS ONE* 12, e0169851. doi: 10.1371/journal.pone.0169851
- Elmentaite, R., Kumasaka, N., Roberts, K., Fleming, A., Dann, E., King, H. W., et al. (2021). Cells of the human intestinal tract mapped across space and time. *Nature* 597, 250–255. doi: 10.1038/s41586-021-03852-1
- Fennema, D., Phillips, I. R., and Shephard, E. A. (2016). Trimethylamine and Trimethylamine N-Oxide, a Flavin-Containing Monooxygenase 3 (FMO3)-Mediated Host-Microbiome Metabolic Axis Implicated in Health and Disease. *Drug Metab Dispos* 44, 1839–1850. doi: 10.1124/dmd.116.070615

- Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P., and Duncan, S. H. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9, 577–589. doi: 10.1038/nrgastro.2012.156
- Fraga, A. Z., Campos, P. H. R. F., Hauschild, L., Chalvon-Demersay, T., Beaumont, M., and Le Floc’h, N. (2023). A blend of functional amino acids and grape polyphenols improves the pig capacity to cope with an inflammatory challenge caused by poor hygiene of housing conditions. *BMC Vet Res* 19, 25. doi: 10.1186/s12917-023-03580-w
- Frese, S. A., Parker, K., Calvert, C. C., and Mills, D. A. (2015). Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning. *Microbiome* 3, 28. doi: 10.1186/s40168-015-0091-8
- Gehart, H., and Clevers, H. (2019). Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16, 19–34. doi: 10.1038/s41575-018-0081-y
- Ghosh, S., Whitley, C. S., Haribabu, B., and Jala, V. R. (2021). Regulation of Intestinal Barrier Function by Microbial Metabolites. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 11, 1463–1482. doi: 10.1016/j.jcmgh.2021.02.007
- Gonzalez, L. M., Williamson, I., Piedrahita, J. A., Blikslager, A. T., and Magness, S. T. (2013). Cell Lineage Identification and Stem Cell Culture in a Porcine Model for the Study of Intestinal Epithelial Regeneration. *PLOS ONE* 8, e66465. doi: 10.1371/journal.pone.0066465
- Goubern, M., Andriamihaja, M., Nübel, T., Blachier, F., and Bouillaud, F. (2007). Sulfide, the first inorganic substrate for human cells. *The FASEB Journal* 21, 1699–1706. doi: 10.1096/fj.06-7407com
- Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Denis, S., Beaumont, M., Van de Wiele, T., Forano, E., et al. (2021a). Weaning-associated feed deprivation stress causes microbiota disruptions in a novel mucin-containing in vitro model of the piglet colon (MPigut-IVM). *J Anim Sci Biotechnol* 12, 75. doi: 10.1186/s40104-021-00584-0
- Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Garrido, J. J., Denis, S., Jiménez-Marín, A., Beaumont, M., et al. (2021b). Pathogen Challenge and Dietary Shift Alter Microbiota Composition and Activity in a Mucin-Associated in vitro Model of the Piglet Colon (MPigut-IVM) Simulating Weaning Transition. *Front Microbiol* 12, 703421. doi: 10.3389/fmicb.2021.703421
- Guerbette, T., Beaumont, M., Andriamihaja, M., Ciesielski, V., Perrin, J.-B., Janvier, R., et al. (2023). Obesogenic diet leads to luminal overproduction of the complex IV inhibitor H₂S and mitochondrial dysfunction in mouse colonocytes. *The FASEB Journal* 37, e22853. doi: 10.1096/fj.202201971R
- Guo, C.-J., Allen, B. M., Hiam, K. J., Dodd, D., Van Treuren, W., Higginbottom, S., et al. (2019). Depletion of microbiome-derived molecules in the host using *Clostridium* genetics. *Science* 366, eaav1282. doi: 10.1126/science.aav1282
- Han, X., Mslati, M. A., Davies, E., Chen, Y., Allaire, J. M., and Vallance, B. A. (2021). Creating a More Perfect Union: Modeling Intestinal Bacteria-Epithelial Interactions Using Organoids. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 12, 769–782. doi: 10.1016/j.jcmgh.2021.04.010
- Hayes, J. A., Lunger, A. W., Sharma, A. S., Fernez, M. T., Carrier, R. L., Koppes, A. N., et al. (2023). Engineered bacteria titrate hydrogen sulfide and induce concentration-dependent effects on the host in a gut microphysiological system. *Cell Reports* 42, 113481. doi: 10.1016/j.celrep.2023.113481
- Hendriks, T., and Schnabl, B. (2019). Indoles: metabolites produced by intestinal bacteria capable of controlling liver disease manifestation. *Journal of Internal Medicine* 286, 32–40. doi: 10.1111/joim.12892
- Henning, S. J. (1985). Ontogeny of Enzymes in the Small Intestine. *Annual Review of Physiology* 47, 231–245. doi: 10.1146/annurev.ph.47.030185.001311
- Holloway, E. M., Wu, J. H., Czerwinski, M., Sweet, C. W., Wu, A., Tsai, Y.-H., et al. (2020). Differentiation of Human Intestinal Organoids with Endogenous Vascular Endothelial Cells. *Dev Cell* 54, 516–528.e7. doi: 10.1016/j.devcel.2020.07.023
- Holthaus, D., Delgado-Betancourt, E., Aebischer, T., Seeber, F., and Klotz, C. (2021). Harmonization of Protocols for Multi-Species Organoid Platforms to Study the Intestinal Biology of *Toxoplasma gondii* and Other Protozoan Infections. *Frontiers in Cellular and Infection*

- Microbiology* 10. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.610368> (Accessed February 22, 2023).
- Hooper, L. V. (2004). Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends Microbiol* 12, 129–134. doi: 10.1016/j.tim.2004.01.001
- Hsu, C. L., and Schnabl, B. (2023). The gut–liver axis and gut microbiota in health and liver disease. *Nat Rev Microbiol*, 1–15. doi: 10.1038/s41579-023-00904-3
- Jalili-Firoozinezhad, S., Gazzaniga, F. S., Calamari, E. L., Camacho, D. M., Fadel, C. W., Bein, A., et al. (2019). A complex human gut microbiome cultured in an anaerobic intestine-on-a-chip. *Nat Biomed Eng* 3, 520–531. doi: 10.1038/s41551-019-0397-0
- Kaiko, G. E., Ryu, S. H., Koues, O. I., Collins, P. L., Solnica-Krezel, L., Pearce, E. J., et al. (2016). The Colonic Crypt Protects Stem Cells from Microbiota-Derived Metabolites. *Cell* 165, 1708–1720. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.018
- Kardia, E., Frese, M., Smertina, E., Strive, T., Zeng, X.-L., Estes, M., et al. (2021). Culture and differentiation of rabbit intestinal organoids and organoid-derived cell monolayers. *Sci Rep* 11, 5401. doi: 10.1038/s41598-021-84774-w
- Knudsen, C., Neyrinck, A. M., Leyrolle, Q., Baldin, P., Leclercq, S., Rodriguez, J., et al. (2021). Hepatoprotective Effects of Indole, a Gut Microbial Metabolite, in Leptin-Deficient Obese Mice. *J Nutr* 151, 1507–1516. doi: 10.1093/jn/nxab032
- Kraiczy, J., Nayak, K. M., Howell, K. J., Ross, A., Forbester, J., Salvestrini, C., et al. (2019). DNA methylation defines regional identity of human intestinal epithelial organoids and undergoes dynamic changes during development. *Gut* 68, 49–61. doi: 10.1136/gutjnl-2017-314817
- Li, L., Fu, F., Guo, S., Wang, H., He, X., Xue, M., et al. (2019). Porcine Intestinal Enteroids: a New Model for Studying Enteric Coronavirus Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infection and the Host Innate Response. *Journal of Virology* 93, 10.1128/jvi.01682-18. doi: 10.1128/jvi.01682-18
- Liu, X., Beaumont, M., Walker, F., Chaumontet, C., Andriamihaja, M., Matsumoto, H., et al. (2013). Beneficial Effects of an Amino Acid Mixture on Colonic Mucosal Healing in Rats. *Inflammatory Bowel Diseases* 19, 2895–2905. doi: 10.1097/01.MIB.0000435849.17263.c5
- Ma, L., Li, H., Hu, J., Zheng, J., Zhou, J., Botchlett, R., et al. (2020). Indole Alleviates Diet-Induced Hepatic Steatosis and Inflammation in a Manner Involving Myeloid Cell 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase 3. *Hepatology* 72, 1191–1203. doi: 10.1002/hep.31115
- Miquel, S., Beaumont, M., Martín, R., Langella, P., Braesco, V., and Thomas, M. (2015). A proposed framework for an appropriate evaluation scheme for microorganisms as novel foods with a health claim in Europe. *Microbial Cell Factories* 14, 48. doi: 10.1186/s12934-015-0229-1
- Moeser, A. J., Pohl, C. S., and Rajput, M. (2017). Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. *Animal Nutrition* 3, 313–321. doi: 10.1016/j.aninu.2017.06.003
- Mohammad, M. A., Didelija, I. C., Stoll, B., Burrin, D. G., and Marini, J. C. (2020). Modeling age-dependent developmental changes in the expression of genes involved in citrulline synthesis using pig enteroids. *Physiol Rep* 8, e14565. doi: 10.14814/phy2.14565
- Mussard, E., Lencina, C., Boudry, G., Achard, C. S., Klotz, C., Combes, S., et al. (2023). Culture of Piglet Intestinal 3D Organoids from Cryopreserved Epithelial Crypts and Establishment of Cell Monolayers. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, e64917. doi: 10.3791/64917
- Mussard, E., Lencina, C., Gallo, L., Barilly, C., Poli, M., Feve, K., et al. (2022). The phenotype of the gut region is more stably retained than developmental stage in piglet intestinal organoids. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.983031> (Accessed September 1, 2022).
- Mussard, E., Pouzet, C., Helies, V., Pascal, G., Fourre, S., Cherbuy, C., et al. (2020). Culture of rabbit caecum organoids by reconstituting the intestinal stem cell niche in vitro with pharmacological inhibitors or L-WRN conditioned medium. *Stem Cell Res* 48, 101980. doi: 10.1016/j.scr.2020.101980
- Nikolaev, M., Mitrofanova, O., Broguiere, N., Geraldo, S., Dutta, D., Tabata, Y., et al. (2020). Homeostatic mini-intestines through scaffold-guided organoid morphogenesis. *Nature* 585, 574–578. doi: 10.1038/s41586-020-2724-8

- Nowland, T. L., Kirkwood, R. N., and Pluske, J. R. (2022). Review: Can early-life establishment of the piglet intestinal microbiota influence production outcomes? *animal* 16, 100368. doi: 10.1016/j.animal.2021.100368
- Oberli, M., Douard, V., Beaumont, M., Jaoui, D., Devime, F., Laurent, S., et al. (2018). Lipo-Protein Emulsion Structure in the Diet Affects Protein Digestion Kinetics, Intestinal Mucosa Parameters and Microbiota Composition. *Molecular Nutrition & Food Research* 62, 1700570. doi: 10.1002/mnfr.201700570
- Paës, C., Gidenne, T., Bébin, K., Duperray, J., Gohier, C., Guené-Grand, E., et al. (2022). Early Introduction of Plant Polysaccharides Drives the Establishment of Rabbit Gut Bacterial Ecosystems and the Acquisition of Microbial Functions. *mSystems*, e0024322. doi: 10.1128/msystems.00243-22
- Parikh, K., Antanaviciute, A., Fawcner-Corbett, D., Jagielowicz, M., Aulicino, A., Lagerholm, C., et al. (2019). Colonic epithelial cell diversity in health and inflammatory bowel disease. *Nature* 567, 49–55. doi: 10.1038/s41586-019-0992-y
- Paul, M., Leblanc-Maridor, M., Rousset, N., Hemonic, A., Marguerie, J., Coz, P. le, et al. (2022). Réduction de l'usage des antibiotiques en filières monogastriques : état d'avancement et perspectives. *INRAE Productions Animales* 35, 293–306. doi: 10.20870/productions-animales.2022.35.4.7322
- Pinton, P., and Oswald, I. P. (2014). Effect of deoxynivalenol and other Type B trichothecenes on the intestine: a review. *Toxins (Basel)* 6, 1615–1643. doi: 10.3390/toxins6051615
- Portune, K. J., Beaumont, M., Davila, A.-M., Tomé, D., Blachier, F., and Sanz, Y. (2016). Gut microbiota role in dietary protein metabolism and health-related outcomes: The two sides of the coin. *Trends in Food Science & Technology* 57, 213–232. doi: 10.1016/j.tifs.2016.08.011
- Sabapaty, A., Lin, P.-Y., and Dunn, J. C. Y. (2024). Effect of air-liquid interface on cultured human intestinal epithelial cells. *FASEB Bioadv* 6, 41–52. doi: 10.1096/fba.2023-00132
- Salvi, P. S., and Cowles, R. A. (2021). Butyrate and the Intestinal Epithelium: Modulation of Proliferation and Inflammation in Homeostasis and Disease. *Cells* 10, 1775. doi: 10.3390/cells10071775
- Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., et al. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262–265. doi: 10.1038/nature07935
- Singh, R., Chandrashekarappa, S., Bodduluri, S. R., Baby, B. V., Hegde, B., Kotla, N. G., et al. (2019). Enhancement of the gut barrier integrity by a microbial metabolite through the Nrf2 pathway. *Nat Commun* 10, 89. doi: 10.1038/s41467-018-07859-7
- Teunis, C., Nieuwdorp, M., and Hanssen, N. (2022). Interactions between Tryptophan Metabolism, the Gut Microbiome and the Immune System as Potential Drivers of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Metabolic Diseases. *Metabolites* 12, 514. doi: 10.3390/metabo12060514
- Thiagarajah, J. R., Donowitz, M., and Verkman, A. S. (2015). Secretory diarrhoea: mechanisms and emerging therapies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12, 446–457. doi: 10.1038/nrgastro.2015.111
- van der Hee, B., Loonen, L. M. P., Taverne, N., Taverne-Thiele, J. J., Smidt, H., and Wells, J. M. (2018). Optimized procedures for generating an enhanced, near physiological 2D culture system from porcine intestinal organoids. *Stem Cell Research* 28, 165–171. doi: 10.1016/j.scr.2018.02.013
- Wang, R., Cao, S., Bashir, M. E. H., Hesser, L. A., Su, Y., Hong, S. M. C., et al. (2023a). Treatment of peanut allergy and colitis in mice via the intestinal release of butyrate from polymeric micelles. *Nat. Biomed. Eng* 7, 38–55. doi: 10.1038/s41551-022-00972-5
- Wang, X., Hu, Y., Zhu, X., Cai, L., Farooq, M. Z., and Yan, X. (2023b). Bacteroides-derived isovaleric acid enhances mucosal immunity by facilitating intestinal IgA response in broilers. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 14, 4. doi: 10.1186/s40104-022-00807-y
- Whitfield-Cargile, C. M., Cohen, N. D., Chapkin, R. S., Weeks, B. R., Davidson, L. A., Goldsby, J. S., et al. (2016). The microbiota-derived metabolite indole decreases mucosal inflammation and injury in a murine model of NSAID enteropathy. *Gut Microbes* 7, 246–261. doi: 10.1080/19490976.2016.1156827

- Wikoff, W. R., Anfora, A. T., Liu, J., Schultz, P. G., Lesley, S. A., Peters, E. C., et al. (2009). Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 3698–3703. doi: 10.1073/pnas.0812874106
- Yao, C. K., Rotbart, A., Ou, J. Z., Kalantar-Zadeh, K., Muir, J. G., and Gibson, P. R. (2018). Modulation of colonic hydrogen sulfide production by diet and mesalazine utilizing a novel gas-profiling technology. *Gut Microbes* 9, 510–522. doi: 10.1080/19490976.2018.1451280
- Zhao, Y., Chen, F., Wu, W., Sun, M., Bilotta, A. J., Yao, S., et al. (2018). GPR43 mediates microbiota metabolite SCFA regulation of antimicrobial peptide expression in intestinal epithelial cells via activation of mTOR and STAT3. *Mucosal Immunol* 11, 752–762. doi: 10.1038/mi.2017.118