



**HAL**  
open science

# Évaluation des effets du butyrate sur la barrière épithéliale intestinale en présence de déoxynivalénol dans un modelé d'organoïdes de porcelets

Julie Alberge

► **To cite this version:**

Julie Alberge. Évaluation des effets du butyrate sur la barrière épithéliale intestinale en présence de déoxynivalénol dans un modelé d'organoïdes de porcelets. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04350050

**HAL Id: dumas-04350050**

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04350050v1>

Submitted on 18 Dec 2023

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

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

# ÉVALUATION DES EFFETS DU BUTYRATE SUR LA BARRIÈRE EPITHELIALE INTESTINALE EN PRESENCE DE DEOXYNIVALENOL DANS UN MODELE D'ORGANOÏDES DE PORCELETS

---

THESE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**ALBERGE Julie, Nancie**

**Directrice de thèse : Mme Annabelle MEYNADIER**

---

## JURY

PRESIDENT :

**M. Stéphane BERTAGNOLI**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ASSEESSEURES :

**Mme Annabelle MEYNADIER**

**Mme Aude FERRAN**

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

**M. Martin BEAUMONT**

Chargé de recherche de l'INRAE UMR GenPhySE

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation  
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

**Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire**

**Directeur : Professeur Pierre SANS**

**PROFESSEURS CLASSE  
EXCEPTIONNELLE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

**PROFESSEURS 1<sup>ère</sup>  
CLASSE**

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*

**PROFESSEURS 2<sup>ème</sup>  
CLASSE**

- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*

Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*  
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

#### **MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE**

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*  
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*  
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
Mme **PRIYENKO Nathalie**, *Alimentation*

#### **MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE**

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*  
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*  
M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*  
M. **COMBARROS Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*  
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*  
Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*  
Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*  
M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*  
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*  
M. **FERCHIOU Ahmed**, *Economie de santé des bovins*  
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*  
M. **FUSADE-BOYER Maxime**, *Microbiologie et infectiologie*  
M. **GAIDE Nicolas**, *Anatomie pathologique*  
Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*  
Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*  
M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*  
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*  
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*  
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*  
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*  
M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales réglementées*  
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

#### **INGENIEURS DE RECHERCHE**

M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*  
M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*  
M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*  
M. **CROVILLE Guillaume**, *Virologie et génomique cliniques*  
Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*  
M. **DELPONT Mattias**, *Clinique Aviaire*  
Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*  
Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*  
Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*  
Mme **GRISEZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*

Mme **LAYSSOL-LAMOUR Catherine**, *Imagerie Médicale*  
Mme **POUJADE Agnès**, *Anatomie pathologique Vétérinaire*  
Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*  
M. **RAMON PORTUGAL Felipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*  
M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*  
Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*  
Mme **SAADA Chloé**, *Gestion intégrée de la santé des ruminants*

## **Remerciements**

A mon jury de thèse,

### **A Madame le Professeur Annabelle Meynadier**

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Alimentation*

Qui m'a fait l'honneur d'encadrer cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes hommages respectueux.

### **A Monsieur le Professeur Stéphane Bertagnoli**

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Pathologie infectieuse*

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes hommages respectueux.

### **A Madame le Docteur Aude Ferran**

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Physiologie*

Qui m'a fait l'honneur d'accepter de prendre part à mon jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes hommages respectueux.

Et,

### **A Monsieur Martin Beaumont**

Chargé de recherche de l'INRAE UMR GenPhySE

*Nutrition et Ecosystèmes Digestifs*

Pour avoir accepté d'encadrer ce travail et pour m'avoir fait confiance. Pour sa disponibilité sans faille et ses conseils. Très sincères remerciements.

# Table des matières

Remerciements .....	5
Table des matières .....	6
Table des illustrations.....	8
Abréviations .....	10
I. Introduction.....	11
A. Problématiques des mycotoxines en élevage porcin .....	11
B. Structure et fonctionnement de la barrière intestinale.....	13
C. Effets du déoxynivalénol sur la barrière intestinale .....	17
D. Effets du butyrate sur la barrière intestinale.....	21
E. Effets combinés du butyrate et du déoxynivalénol .....	26
F. Présentation des organoïdes intestinaux de porcelets .....	28
I. Matériel et méthode .....	31
A. Culture des organoïdes .....	31
1. Etude des effets dose-réponse du déoxynivalénol.....	32
2. Etude des effets du butyrate et du déoxynivalénol.....	33
3. Etude des effets du butyrate sur le « stress ribotoxique » .....	34
B. Mesure de la TEER .....	35
C. Mesure de la perméabilité transépithéliale avec le FITC-dextran 4 kDa.....	35
D. Mesure de l'activité de la LDH .....	35
E. ELISA IL8 (CXCL8) .....	36
F. Dosage du lysozyme.....	36
G. Analyse de l'expression de gènes.....	37
1. Par qPCR.....	37
2. Par qPCR en microfluidique (Fluidigm) .....	37
H. Obtention de lysats protéiques .....	37
I. Microscopie confocale .....	38
J. Microscopie électronique à transmission .....	38

K. Statistiques .....	39
II. Résultats.....	40
A. Etude dose-réponse des effets du déoxynivalénol.....	40
1. Effets de la concentration du déoxynivalénol sur la perméabilité épithéliale.....	41
2. Effets de la concentration du déoxynivalénol sur le renouvellement cellulaire.....	42
3. Effets de la concentration du déoxynivalénol sur la différenciation cellulaire .....	43
4. Effets de la concentration du déoxynivalénol sur les mécanismes de défense .....	46
B. Etude des effets du butyrate et du déoxynivalénol.....	48
1. Effets du butyrate et du déoxynivalénol sur la perméabilité épithéliale .....	49
2. Effets du butyrate et du déoxynivalénol sur le renouvellement cellulaire .....	52
3. Effets du butyrate et du déoxynivalénol sur la différenciation cellulaire .....	52
4. Effets du butyrate et du déoxynivalénol sur les mécanismes de défense.....	53
C. Etude des effets du butyrate sur le « stress ribotoxique » .....	57
III. Discussion.....	61
A. Intérêt du modèle des monocouches dérivées d’organoïdes dans l’étude des effets du déoxynivalénol sur l’épithélium intestinal porcin .....	61
B. Effets du déoxynivalénol et leur atténuation par le butyrate.....	63
C. Mécanismes pouvant intervenir dans les effets protecteurs du butyrate .....	65
D. Applications en élevage porcin .....	67
E. Conclusion.....	67
IV. Bibliographie.....	69
Annexes.....	76
Annexe 1 – Etude de la morphologie des cellules des monocouches de cellules dérivées d’organoïdes .....	76
Annexe 2 – Protocole de culture des organoïdes et des monocouches .....	77

## Table des illustrations

Figure 1 : Structure du déoxynivalénol et les modifications possibles de sa structure .....	11
Figure 2 : Structure et environnement de l'épithélium intestinal de l'intestin grêle et du côlon .....	14
Figure 3 : Voies de signalisation impliquées dans l'organisation de l'épithélium intestinal .	16
Figure 4 : Les cellules épithéliales intestinales exposées au déoxynivalénol subissent un « stress ribotoxique » .....	18
Figure 5 : Le déoxynivalénol induit l'activation des voies de signalisation MAPK et PI3K/AKT .....	19
Figure 6 : Les effets du butyrate sont compartimentés dans l'axe crypte-villosité .....	24
Figure 7 : Culture d'organoïdes intestinaux chez les animaux d'élevage .....	28
Figure 8 : Culture de monocouches de cellules issues d'organoïdes intestinaux .....	30
Figure 9 : Méthodes de culture des organoïdes intestinaux de porcelet .....	32
Figure 10 : Schéma expérimental pour l'étude des effets dose-réponse du déoxynivalénol ..	33
Figure 11 : Schéma expérimental pour l'étude des effets du butyrate et du déoxynivalénol .	34
Figure 12 : Schéma expérimental pour l'étude des effets du butyrate sur le « stress ribotoxique » .....	34
Figure 13 : Effets de la concentration de déoxynivalénol sur l'expression de l'ensemble des gènes .....	40
Figure 14 : Effets de la concentration de déoxynivalénol sur la perméabilité épithéliale .....	41
Figure 15 : Effets de la concentration de déoxynivalénol sur l'expression de gènes impliqués dans les jonctions cellulaires .....	42
Figure 16 : Effets de la concentration de déoxynivalénol sur l'expression de gènes impliqués dans le renouvellement cellulaire .....	43
Figure 17 : Effets de la concentration de déoxynivalénol sur les dommages cellulaires .....	44
Figure 18 : Effets de la concentration de déoxynivalénol sur l'expression de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire .....	45

Figure 19 : Effets de la concentration de déoxynivalénol sur l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire .....	47
Figure 20 : Effets de la concentration de déoxynivalénol sur l'expression de gènes impliqués dans l'équilibre redox .....	47
Figure 21 : Effets du butyrate et du déoxynivalénol sur l'expression de l'ensemble des gènes .....	48
Figure 22 : Effets du butyrate et du déoxynivalénol sur la perméabilité épithéliale .....	49
Figure 23 : Effets du butyrate et du déoxynivalénol sur les jonctions cellulaires .....	50
Figure 24 : Effets du butyrate et du déoxynivalénol sur le renouvellement cellulaire .....	51
Figure 25 : Effets du butyrate et du déoxynivalénol sur les dommages cellulaires .....	52
Figure 26 : Effets du butyrate et du déoxynivalénol sur la morphologie des cellules .....	54-55
Figure 27 : Effets du butyrate et du déoxynivalénol sur l'expression de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire .....	55
Figure 28 : Effets du butyrate et du déoxynivalénol sur l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire .....	56
Figure 29 : Effets du butyrate et du déoxynivalénol sur l'expression de gènes impliqués dans l'équilibre redox .....	56
Figure 30 : Effets du butyrate et de l'anisomycine sur l'expression des gènes .....	58-59
Figure 31 : Effets du butyrate et de l'anisomycine sur la perméabilité épithéliale .....	59
Figure 32 : Effets du butyrate et de l'anisomycine sur les dommages cellulaires .....	60

## **Abréviations**

ANI : Anisomycine

BUT : Butyrate

BMP : Protéines morphogénétiques osseuses – Bone morphogenetic proteins

CCK : Cholécystokinine

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DON : Déoxynivalénol

EGF : Facteurs de croissance épidermique

ERK 1 et 2 : Protéines « extracellular signal-regulated kinases » 1 et 2

HBSS : Solution saline équilibrée de Hanks

HDACs : Histones désacétylases

LDH : Lactate déshydrogénase

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

PHA : Phalloïdine

PYY : Peptide YY

qPCR : PCR en temps réel

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

SVF : Sérum de veau fœtal

TEER : Résistance électrique transépithéliale

TLR : Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires

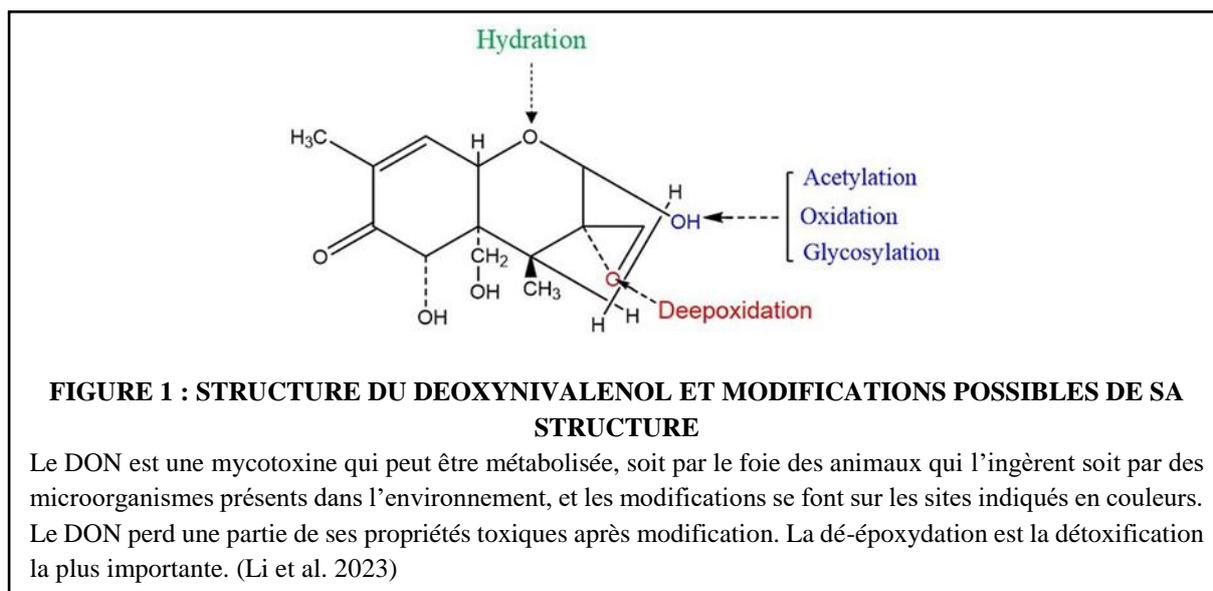
TSA : Trichostatine A

ZO-1 : Zonula-occludens 1

# I. Introduction

## A. Problématiques des mycotoxines en élevage porcin

L'élevage porcin français a subi une baisse de production de 0,8% en 10 ans, mais la viande porcine reste tout de même la plus consommée en France avec 31,7 kg de viande par personne et par an en 2021 (Agreste 2023). De nombreuses recommandations entrent en jeu dans la gestion technico-économique d'un élevage porcin pour préserver le bien-être animal et la qualité de la production. Cependant, certains problèmes persistent malgré les solutions mises en place, comme notamment la présence de mycotoxines dans les denrées alimentaires. Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par des champignons et certaines d'entre elles ont des effets toxiques (Holanda, Kim 2021). La contamination des aliments par les mycotoxines peut avoir lieu à toutes les étapes de la production de l'aliment, de la culture des céréales à leur distribution en élevage. De plus, il est prédit que le réchauffement climatique augmente la contamination des cultures céréalières par les mycotoxines à l'avenir (Holanda, Kim 2021) étant donné qu'elle dépend des conditions météorologiques.



Le déoxynivalénol (DON) (Figure 1) est une mycotoxine de la famille des trichothécènes (type B) (Pinton, Oswald 2014; Lessard et al. 2015), produite par des champignons du genre *Fusarium* (principales espèces : *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum*). Il s'agit de la principale mycotoxine retrouvée dans les céréales lorsqu'elles sont mal conservées. Le DON serait présent dans plus de 60% de la production céréalière mondiale (Eskola et al. 2020). Le DON persiste dans les produits transformés de par sa résistance aux fortes températures, aux fortes pressions et aux milieux acides. Le DON est toxique pour les humains mais également pour de nombreuses espèces animales, dont le porc chez qui les céréales sont un élément

majoritaire dans l'alimentation. L'étude des effets du DON s'inscrit parfaitement dans les enjeux de la filière porcine actuelle. La santé des porcs est actuellement impactée par la présence croissante de mycotoxines, et plus particulièrement du DON (Auffray, Gouault 2023), qui induisent une diminution du poids des porcs intoxiqués (Holanda, Kim 2021 ; Pierron, Alassane-Kpembé, Oswald 2016). Cette baisse de poids des porcelets réduit la compétitivité des éleveurs porcins français sur le marché mondial de la viande de porc dans un contexte d'augmentation des prix des matières premières (Auffray, Gouault 2023). De plus, la filière porcine doit s'adapter face au changement climatique, ce qui comprend la gestion de l'augmentation du risque des mycotoxines (Holanda, Kim 2021). Quel que soit le type d'exploitation, les porcs sont nourris avec une ration contenant au moins 50% de céréales, principalement du maïs et de l'orge. De plus, le porc est l'espèce la plus sensible aux effets du DON (Pinton, Oswald 2014; Bracarense et al. 2012), ce qui peut être expliqué par des différences de capacité de métabolisation : les porcs ne réalisent pas la dé-époxydation du DON (Figure 1) qui a lieu dans le foie d'autres espèces, et à la place il y a une glucuronoconjugaison du DON (Pinton, Oswald 2014). Cependant il existe des microorganismes utilisés en tant que probiotiques, *Bacillus subtilis* ZZ et *Bacillus licheniformis* par exemple (Li et al. 2023), qui sont tout de même capable de réaliser la dé-époxydation du DON (Islam et al. 2012; Pierron et al. 2016). Cette transformation permet de retirer la fonction époxyde du DON qui est la plus toxique (Figure 1). La commission européenne recommande des concentrations en DON inférieures à 0,9 mg/kg dans les aliments destinés aux porcs (Holanda, Kim 2021; Publications Office of the European Union 2016), alors que l'on retrouve en moyenne des concentrations inférieures à 5 mg/kg dans ces aliments et pouvant aller jusqu'à 50 mg/kg (Holanda, Kim 2021). Des concentrations de 1 mg/kg suffisent à induire une toxicité chez le porc, contre 20 mg/kg chez les ruminants (Recharla et al. 2022). Une exposition aiguë au DON engendre des vomissements (le DON est aussi appelé « vomitoxine ») et de la diarrhée. Une exposition chronique avec de faibles concentrations (1-3 mg/kg) cause de l'anorexie, qui est renforcée par l'induction de la production des hormones de satiété : le peptide YY (PYY) et la cholécystokinine (CCK) (Pinton, Oswald 2014). Ces effets sont associés à une toxicité importante du DON au niveau de la barrière intestinale (détaillé ci-dessous).

Pour réduire les effets toxiques du DON, les recherches se concentrent sur la diminution de la quantité de DON dans la production céréalière (Recharla et al. 2022). Cependant, les moyens préventifs à disposition ne sont pas suffisants pour réduire la quantité de DON de façon satisfaisante. Les moyens de détoxification physiques et chimiques des aliments ne sont pas utilisables du fait de la destruction trop importante des nutriments par ces processus. La

détoxification biologique est plus prometteuse mais les effets des agents biologiques utilisés montrent encore de nombreuses imperfections (Holanda, Kim 2021). Il existe des composés inorganiques, tels que le charbon actif ou les aluminosilicates, qui empêchent l'absorption du DON par l'organisme grâce à son adsorption avec ces composés, mais leur efficacité sur le DON reste réduite et ils empêchent aussi l'absorption de nutriments et de minéraux, leur utilisation n'est donc pas satisfaisante (Holanda, Kim 2021). Les levures permettent également d'adsorber le DON pour empêcher son absorption, et plus particulièrement les glucans  $\beta$  et  $\delta$  présents dans les parois de ces levures. Les levures permettent également de moduler les réponses immunitaires de l'épithélium intestinal ce qui rend leur utilisation intéressante, mais leur efficacité est réduite sur le DON et elles sont donc insuffisantes pour limiter la contamination des animaux (Holanda, Kim 2021). Enfin, il est également possible d'utiliser des bactéries, essentiellement sous forme inactivées par la chaleur ce qui les rend plus efficaces, qui vont aussi adsorber le DON, comme par exemple *Lactobacillus helveticus* ou *plantarum* (Holanda, Kim 2021). Cependant des bactéries présentes dans le microbiote sont, comme nous l'avons vu, capables de former du dé-époxy-DON qui ne possède pas les propriétés toxiques du DON (Li et al. 2023; Islam et al. 2012; Pierron et al. 2016; Recharla et al. 2022). Il existe donc de nombreuses solutions pour limiter la contamination des individus par le DON mais l'efficacité de ces stratégies reste modérée ou à développer.

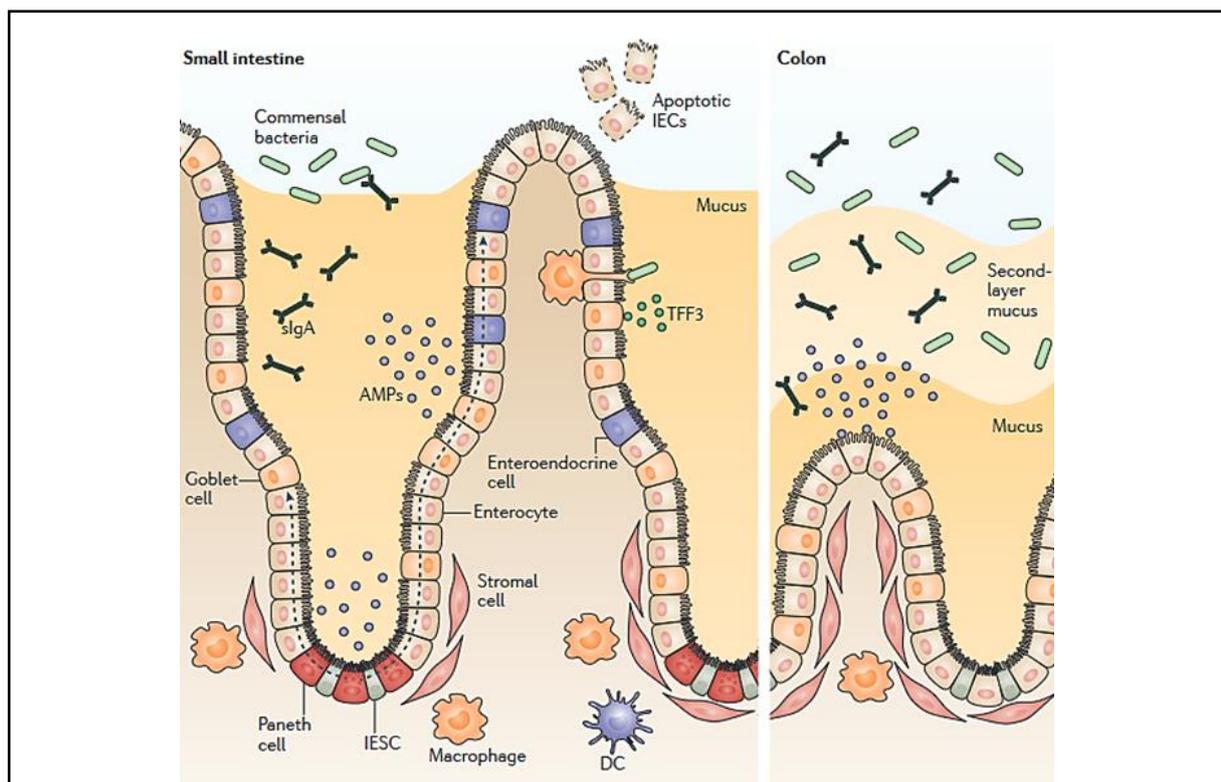
Une autre piste envisagée serait de cibler les métabolites produits par le microbiote intestinal pour limiter la toxicité du DON en renforçant la fonction de barrière de l'intestin (détaillé ci-dessous). Dans une première partie, nous allons donc nous concentrer sur la présentation de la structure et du fonctionnement de la barrière intestinale. Ensuite, nous verrons quels sont les effets du DON sur la barrière intestinale, ainsi que ceux du butyrate (BUT), un métabolite bactérien qui pourrait être utilisé pour contrer les effets du DON, et nous étudierons quels ont été les découvertes faites sur l'utilisation de ces deux composés de façon simultanée. Finalement, nous présenterons le modèle d'étude que nous utiliserons : les monocouches de cellules épithéliales issues d'organoïdes intestinaux de porcelets.

## **B. Structure et fonctionnement de la barrière intestinale**

Le tube digestif possède un rôle de barrière physique, chimique et immunologique contre les pathogènes et les composés toxiques présents dans la lumière de l'intestin par l'association de cellules immunitaires situées dans la lamina propria et des cellules de l'épithélium intestinal (Peterson, Artis 2014). L'épithélium intestinal est organisé en une monocouche de cellules

épithéliales jointives grâce à un réseau de jonctions cellulaires, permettant à l'épithélium intestinal de former une barrière semi-perméable. Dans l'intestin grêle, la structure de l'épithélium intestinal est formée de villosités et de cryptes (Van Der Flier, Clevers 2009).

Les cellules épithéliales différenciées sont situées en majorité au niveau des villosités et comprennent 3 types principaux (Peterson, Artis 2014; Van Der Flier, Clevers 2009; Gehart, Clevers 2019) (Figure 2). Premièrement les entérocytes, qui représentent environ 80% des cellules épithéliales intestinales, ont pour rôle de contribuer à la digestion et à l'absorption des nutriments présents dans la lumière intestinale. On retrouve également des cellules en gobelet (cellules caliciformes), qui sont responsables de la sécrétion d'une couche de mucus, constituée principalement d'eau et de mucines. Ces cellules sont également présentes dans les cryptes pour y produire du mucus. Enfin, les cellules entéroendocrines sont responsables de la sécrétion dans la circulation sanguine de différentes hormones, telles que le glucagon-like-peptide ou la gréline. On en compte jusqu'à 15 types de cellules entéroendocrines différents.



**FIGURE 2 : STRUCTURE ET ENVIRONNEMENT DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL DE L'INTESTIN GRÊLE (À GAUCHE) ET DU COLON (À DROITE)**

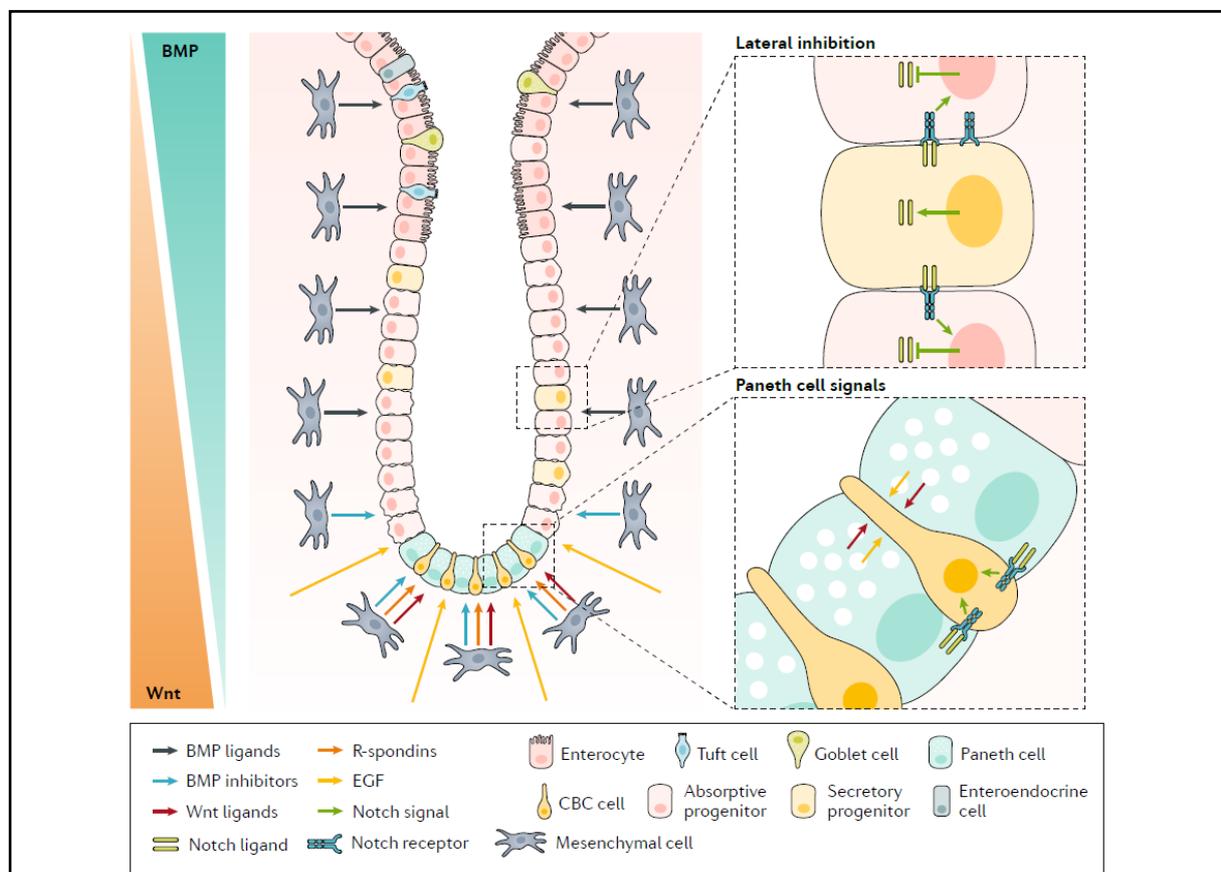
L'épithélium intestinal est organisé en villosités et/ou en cryptes et possède différents types de cellules absorbantes et sécrétrices. Du côté luminal, l'épithélium est recouvert de mucus issus des sécrétions des cellules épithéliales et colonisé par des microorganismes du microbiote. Du côté basal, l'épithélium est en contact des cellules de la lamina propria, notamment des cellules immunitaires. (Peterson, Artis 2014)

Les cellules situées au fond des cryptes intestinales sont les cellules souches et les cellules de Paneth (Van Der Flier, Clevers 2009; Gehart, Clevers 2019) (Figure 2). Les cellules souches sont des cellules pluripotentes qui sont capables de se diviser ce qui permet un renouvellement de l'épithélium intestinal, environ tous les 3 à 5 jours chez le porc (Van Der Flier, Clevers 2009; Claus, Günthner, Letzguss 2007). Les cellules souches restent dans le fond des cryptes et les cellules issues des divisions vont remonter le long de l'axe crypte-villosité et se différencier selon des mécanismes que l'on détaillera par la suite. En plus des cellules souches, on retrouve des cellules de Paneth dans les cryptes. Elles se différencient en remontant vers les villosités, puis une fois différenciées ce sont les seules cellules à être capables de migrer à nouveau au fond des cryptes. Elles ont pour rôle la production de peptides antimicrobiens qui protègent les cellules souches et l'épithélium des bactéries. Le contact direct entre les cellules souches et les cellules de Paneth permet de participer au maintien d'un environnement propice à la prolifération des cellules souches. Cependant la présence de cellules de Paneth dans l'épithélium intestinal des porcs est discutée car des études n'ont pas réussi à les mettre en évidence (Verdile et al. 2019), mais la fonction pourrait être assurée par les cellules sécrétoires du fond de la crypte marquées par REG4 (Regenerating family member 4).

Différentes voies de signalisation jouent alors un rôle important dans la mise en place d'une niche spécifique à la prolifération des cellules souches au fond des cryptes, puis à la différenciation des cellules qui migrent vers le sommet des villosités. La voie Wnt (Gehart, Clevers 2019) est la voie principale impliquée dans le maintien des cellules souches (Figure 3). Les ligands de la voie Wnt, dont principalement Wnt3, sont produits par les cellules de Paneth ainsi que par les cellules du mésenchyme. Ces ligands vont se fixer sur les cellules présentes au fond de la crypte et une cascade de réactions va induire une modification de l'expression de gènes favorisant la prolifération des cellules. Les cellules issues de ces divisions vont alors migrer vers le haut des villosités, suivant un gradient d'activation de la voie Wnt qui diminue des cryptes vers les villosités. La voie des protéines morphogénétiques osseuses (BMP) est également impliquée dans la différenciation épithéliale (Gehart, Clevers 2019) (Figure 3) via des ligands de la superfamille des TGF $\beta$  qui engendrent une régulation de l'expression des gènes favorisant la différenciation. Des inhibiteurs des BMP sont produits par les myofibroblastes et les fibres musculaires lisses au niveau de la base des cryptes, donc il existe un gradient d'activation de la voie BMP qui augmente en s'éloignant de la crypte vers les villosités. Ces deux voies de signalisation permettent l'organisation de l'épithélium intestinal selon laquelle les cellules au fond des cryptes prolifèrent, remontent le long de l'axe cryptes-villosités où elles vont progressivement se différencier pour devenir des cellules matures en

atteignant le sommet des villosités. Il reste une troisième voie importante, la voie Notch, qui va permettre de réguler l'équilibre de différenciation entre les cellules absorbives et sécrétrices (Van Der Flier, Clevers 2009; Gehart, Clevers 2019). Les ligands de la voie Notch sont des protéines transmembranaires présentes sur une cellule (Figure 3), qui doivent entrer en contact avec leurs récepteurs étant également des protéines transmembranaires présentes sur une cellule voisine. Cela crée un équilibre entre les lignées absorbives et sécrétrices en bloquant la différenciation vers la lignée sécrétrice.

Les cellules qui composent l'épithélium intestinal sont au contact du bol alimentaire et vont être impactées par sa composition, notamment lors de la contamination de la ration par du DON.



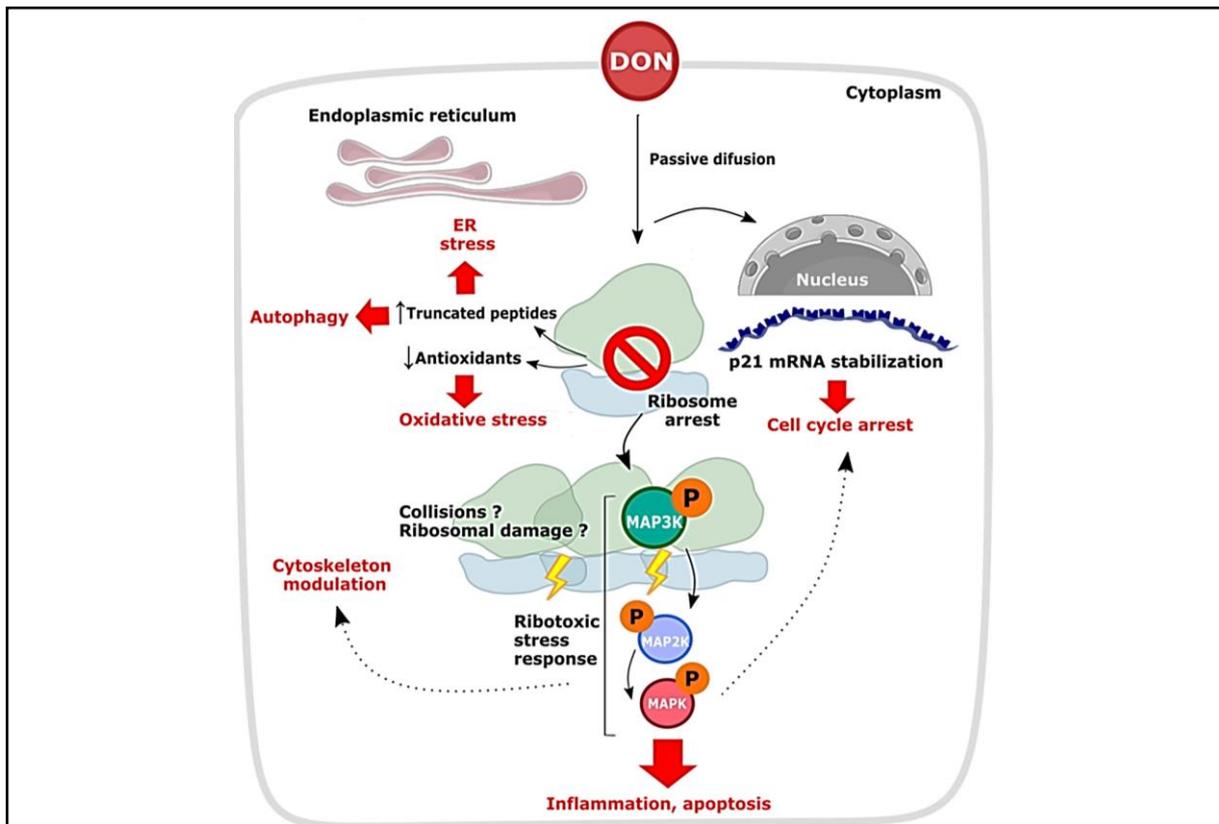
**FIGURE 3 : VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUÉES DANS L'ORGANISATION DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL**

L'activation de la voie Wnt favorise la prolifération des cellules souches présentes au fond des cryptes. L'activation de la voie BMP favorise la différenciation des cellules sur les villosités, et les inhibiteurs de la voie BMP inhibent la différenciation des cellules au fond des cryptes. L'activation de la voie Notch oriente la différenciation des cellules vers la lignée absorbive, permettant de créer un équilibre avec la lignée sécrétrice dans laquelle Notch est inactive. Les gradients formés par ces voies permettent une organisation des cellules épithéliales selon un axe cryptes-villosités. (Gehart, Clevers 2019)

### C. Effets du déoxynivalénol sur la barrière intestinale

Le DON ingéré par les animaux est distribué rapidement à l'ensemble des tissus (Payros et al. 2016) mais les cellules épithéliales intestinales vont être parmi les premières cellules à entrer en contact avec cette mycotoxine (Recharla et al. 2022). Une fois dans les cellules, le DON se lie à la sous-unité 60S du ribosome, ce qui engendre une inhibition de la traduction et une réponse de « stress ribotoxique » (Recharla et al. 2022; Garofalo et al. 2023). Cette réponse induit une activation de la protéine kinase R et de la protéine tyrosine kinase qui vont se lier au ribosome et avoir plusieurs conséquences (Pierron, Alassane-Kpembi, Oswald 2016; Recharla et al. 2022; Payros et al. 2016) : inhiber la traduction, stimuler la production d'activateurs de la transcription ainsi que réguler la prolifération cellulaire et l'apoptose. Cela engendre alors une activation des voies de signalisation des mitogen-activated protein kinases (MAPK) (Holanda, Kim 2021; Recharla et al. 2022) (Figure 4) dont la voie de la protéine p38 ou des protéines « extracellular signal-regulated kinases » 1 et 2 (ERK1/2), qui agissent sur différentes fonctions comme par exemple sur l'organisation du cytosquelette et la régulation de la réponse immunitaire (Figure 5) (Payros et al. 2016). L'activation de la voie des MAPK a également pour effet une activation de l'inflammation (Recharla et al. 2022; Garofalo et al. 2023) que l'on détaillera par la suite (Figure 4). De plus, le « stress ribotoxique » est responsable de l'induction d'un stress oxydant (Garofalo et al. 2023), qui sera également détaillé ensuite, et il est supposé responsable d'une réorganisation du cytosquelette d'actine (Garofalo et al. 2023) probablement via l'activation des voies ERK1/2 (Figure 4).

Les cellules épithéliales intestinales les plus touchées par les effets du DON sont celles présentes dans le jéjunum, et dans une moindre mesure dans l'iléon (Bracarense et al. 2012). Les cellules en prolifération sont également plus sensibles aux effets du DON en comparaison aux cellules différenciées (Luo et al. 2021), ce qui pourrait être expliqué par les besoins plus importants en ARN, ADN et protéines des cellules en prolifération pour pouvoir leur permettre de réaliser un cycle cellulaire. En effet la cytotoxicité induite par le DON est observée dès 10  $\mu$ M sur des cellules prolifératives, contre 30  $\mu$ M sur des cellules différenciées (Luo et al. 2021). Sur ces mêmes cellules, la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER), permettant de quantifier la perméabilité paracellulaire épithéliale ionique, a été impossible sur des cellules prolifératives traitées avec 10  $\mu$ M de DON ce qui signifie que la monocouche de cellules n'a pas réussi à atteindre la confluence, tandis que la TEER mesurée sur des cellules différenciées traitées avec la même concentration de DON a été fortement réduite mais mesurable (Luo et al. 2021). Le DON induit également une modulation de l'expression de nombreux gènes, et cet effet est plus important sur les cellules prolifératives avec 25% de gènes



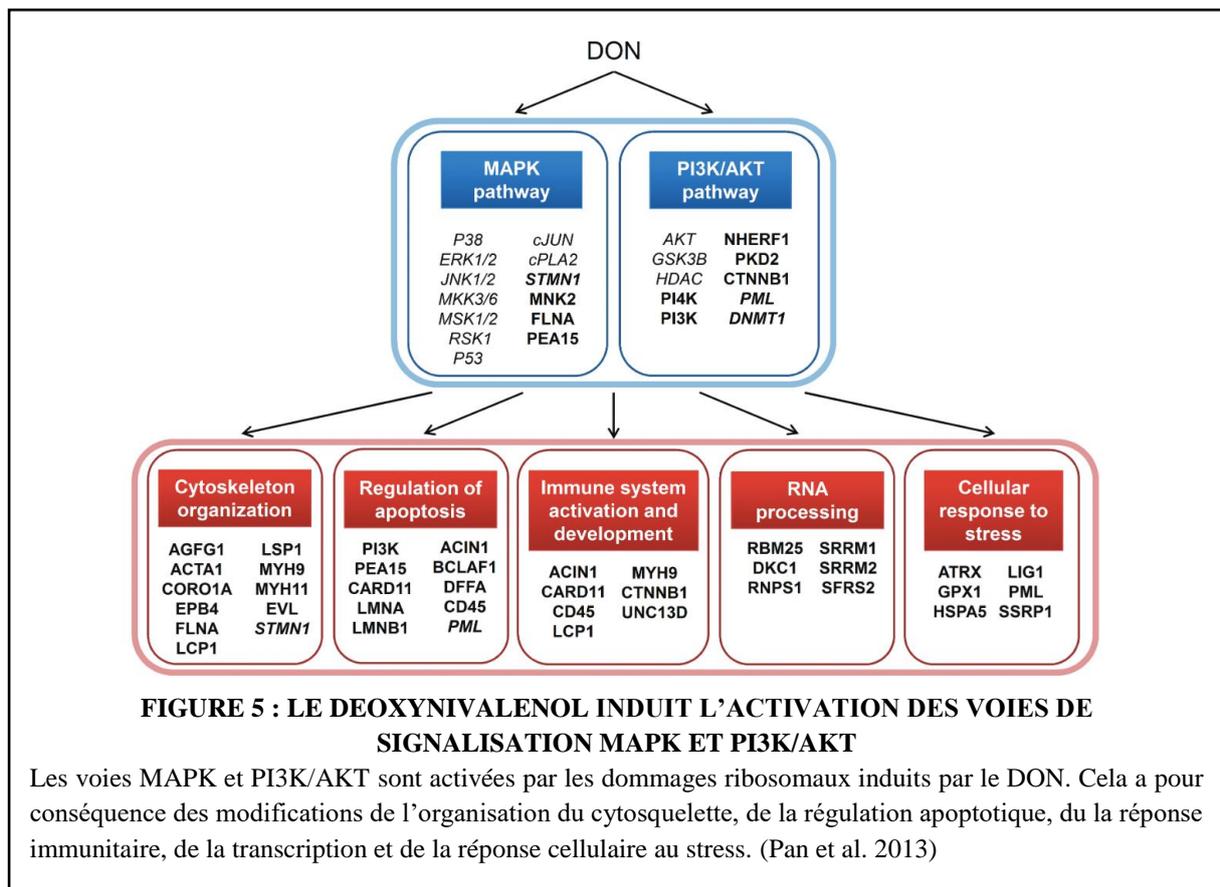
**FIGURE 4 : LES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES EXPOSÉES AU DEOXYNIVALENOL SUBISSENT UN STRESS RIBOTOXIQUE**

Le DON se lie à la sous-unité 60S du ribosome et engendre une réponse appelée « stress ribotoxique ». Il y a une activation des voies MAPK qui vont induire un arrêt du cycle cellulaire, une réponse inflammatoire, l'apoptose des cellules épithéliales et une modification du cytosquelette d'actine. L'arrêt du fonctionnement des ribosomes induit également un stress du réticulum endoplasmique, de l'autophagie ainsi qu'un stress oxydant. (Garofalo et al. 2023)

supplémentaires régulés en comparaison avec ceux retrouvés chez les cellules différenciées (Luo et al. 2021).

Le DON induit une modification de l'équilibre entre l'apoptose et la prolifération (Bracarense et al. 2012). En effet, chez des porcelets nourris avec une ration contaminée par du DON, il a été montré que l'expression du gène BCL2, impliqué dans l'apoptose, est augmentée (Lessard et al. 2015). Sachant que la prolifération cellulaire dans la crypte est la force principale qui entraîne la migration des cellules le long de la villosité, le DON va alors être responsable d'altérations de la structure de l'épithélium intestinal (Luo et al. 2021).

Chez des porcelets nourris avec une ration contaminée par du DON, une atrophie villositaire, une fusion villositaire et une nécrose apicale des villosités ont été retrouvées dans le jéjunum et l'iléon, mais il n'y a pas de modification de la profondeur des cryptes (Pinton, Oswald 2014; Bracarense et al. 2012). On retrouve également des modifications dans la structure des cellules épithéliales



telles qu'une vacuolisation du cytoplasme des entérocytes (Recharla et al. 2022; Bracarense et al. 2012) et une réduction du nombre de ribosomes et de mitochondries (Recharla et al. 2022).

La différenciation des cellules épithéliales intestinales est également impactée par le DON. Cela se retrouve chez des porcelets nourris avec une ration contaminée par du DON, via une diminution du nombre de cellules en gobelet dans le jéjunum et l'iléon (Bracarense et al. 2012). Les modifications de l'état de différenciation des cellules épithéliales intestinales vont avoir un impact sur les fonctions de digestion et d'absorption des entérocytes. Sur des lignées cellulaires humaines, il a été montré que l'exposition des cellules au DON induit une inhibition des transporteurs de glucose car une diminution de l'expression des gènes SGLT1/SLC5A1 et GLUT5 ont été observées (Pinton, Oswald 2014), et la même chose a été montrée chez des poulets (Holanda, Kim 2021). Chez des souris nourries avec une ration contaminée par du DON, le transport du glucose et des acides aminés a été réduit (Pinton, Oswald 2014). La production de peptides antimicrobiens est également impactée par le DON puisqu'il a été montré que l'expression du gène DEFB1, codant pour la  $\beta$ -défensine, est réduite chez des porcelets nourris avec une ration contaminée par du DON (Lessard et al. 2015). De plus, nous avons vu que la voie Notch est impliquée dans la régulation de la différenciation des cellules épithéliales (Van Der Flier, Clevers 2009; Gehart, Clevers 2019). Il a été montré sur des lignées cellulaires intestinales porcines IPEC-J2, que le DON active la voie Notch, ce qui a pour

conséquence de favoriser la différenciation des cellules épithéliales en cellules absorbatives à défaut des cellules sécrétrices (Xiao et al. 2022).

La fonction de barrière physique de l'épithélium intestinal est altérée par le DON, induisant une augmentation de la perméabilité intestinale. Sur des lignées cellulaires humaines (Caco-2) et porcines (IPEC-1), le DON a diminué la TEER et augmenté la perméabilité au FITC-dextran 4 kDa de façon concentration-dépendante sans que cela n'induisse de cytotoxicité (mesure de la Lactate déshydrogénase (LDH)) (Pinton et al. 2009). L'étude des protéines de jonctions serrées de ces cellules a montré que la localisation des protéines de jonctions serrées n'est pas modifiée mais que l'expression des gènes codant pour la claudine 3 et 4 a été réduite (Pinton et al. 2009). L'augmentation de la perméabilité au FITC-dextran 4 kDa et la diminution de l'expression du gène codant pour la claudine 4 ont également été observée sur des explants intestinaux de porcelets (Pinton et al. 2009). Chez des porcelets nourris avec une ration contaminée par du DON, il a été montré que le DON induit une diminution de l'expression des gènes codant pour les claudines 3 et 4 et l'occludine, qui est responsable d'une diminution de la TEER et une augmentation de la perméabilité épithéliale au FITC-dextran 4 kDa (Lessard et al. 2015). Une autre étude a observé une diminution de l'expression du gène codant pour la E-cadherine chez les porcelets (Bracarense et al. 2012).

Le DON va aussi impacter la réponse inflammatoire locale car des cytokines inflammatoires peuvent être produites aussi bien par les cellules immunitaires de la muqueuse que par les cellules épithéliales (Pinton, Oswald 2014). Une étude a montré chez des porcelets nourris avec une ration contaminée par du DON qu'il y a une augmentation de l'expression des gènes codant pour les cytokines IL8 et IFN $\gamma$  dans l'iléon, IL4 dans le jéjunum et la chimiokine CXCL10 dans les deux segments, tandis que les gènes codant pour les cytokines IL1 $\beta$  et IL10 n'ont pas été régulés par l'ingestion de DON (Lessard et al. 2015). Une autre étude menée également sur des porcelets a montré que l'expression des gènes codant pour IL2, IL6, IL12p40, MIP1b mais aussi IL1 $\beta$  est augmentée en présence de DON dans le jéjunum, et les gènes codant pour TNF $\alpha$ , IL6 et IL1 $\beta$  sont surexprimés dans l'iléon des porcelets (Bracarense et al. 2012). Toutes les études ne trouvent pas une régulation identique des différents gènes codants pour des cytokines et des chimiokines, mais il est quand même toujours montré que le DON induit une réponse pro-inflammatoire de l'épithélium (Recharla et al. 2022).

La production de ces cytokines en présence de DON est responsable d'un stress oxydant (Lessard et al. 2015; Garofalo et al. 2023). Il a été montré chez des porcelets nourris avec une ration contaminée par du DON, que l'expression des gènes GPX3, GPX4 et SOD3, qui sont

impliqués dans la protection des cellules contre les dégâts causés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS), est diminuée (Lessard et al. 2015). Au contraire, l'expression des gènes NOS2, impliqué dans la production de ROS, et GPX2, impliqué dans la protection antioxydante des cellules, sont augmentées (Lessard et al. 2015). De plus, le DON réduit l'expression des gènes, PGC1 $\alpha$  et NRF1, impliqués dans la biogenèse mitochondriale, ainsi que les gènes PCK2, MDH1, CPT1A, ACADSB et IDH2, impliqués dans le métabolisme énergétique mitochondrial chez des porcelets nourris avec une ration contaminée par du DON (Ren et al. 2020). La modulation de l'expression de ces gènes par le DON est associée à une altération de la structure des mitochondries – diminution de la masse, forme circulaire, crêtes mitochondriales fragmentées, vacuolisation – ce qui est représentatif d'un stress mitochondrial (Ren et al. 2020).

Le DON est donc responsable de différents effets sur les cellules épithéliales intestinales qui sont : des modifications morphologiques de l'épithélium intestinal, une augmentation de la cytotoxicité, une augmentation de la perméabilité intestinale, une augmentation de l'expression des gènes codant pour des protéines de jonctions serrées, une modification de l'équilibre entre prolifération et différenciation, une modification de la réponse immunitaire innée épithéliale, la mise en place d'un stress oxydant et l'altération des fonctions mitochondriales. Globalement, le DON entraîne donc une rupture de l'homéostasie de l'épithélium intestinal, il serait donc intéressant d'identifier des composés capables de prévenir ces effets délétères.

#### **D. Effets du butyrate sur la barrière intestinale**

Le butyrate est un des acides gras à courte chaîne produit par le microbiote intestinal présent à une concentration comprise entre 10 et 20 mM dans la lumière intestinale (Salvi, Cowles 2021). Il est produit par de nombreuses espèces microbiennes, notamment par le genre *Clostridium*, à partir des fibres et de l'amidon (Salvi, Cowles 2021). Le butyrate luminal est absorbé par les cellules épithéliales intestinales via des transporteurs membranaires apicaux, tels que le monocarboxylate transporter 1 (MCT1) (Claus, Günthner, Letzguss 2007). Il est faiblement métabolisé par les cellules épithéliales intestinales de l'intestin grêle, qui utilisent le glucose comme substrat préférentiel (Salvi, Cowles 2021). Au contraire, 95% du butyrate absorbé est métabolisé par les colonocytes en tant que source d'énergie (Claus, Günthner, Letzguss 2007; Salvi, Cowles 2021). En effet, les cellules épithéliales du gros intestin sont capables d'utiliser le butyrate comme source d'énergie via la  $\beta$ -oxydation (Salvi, Cowles 2021).

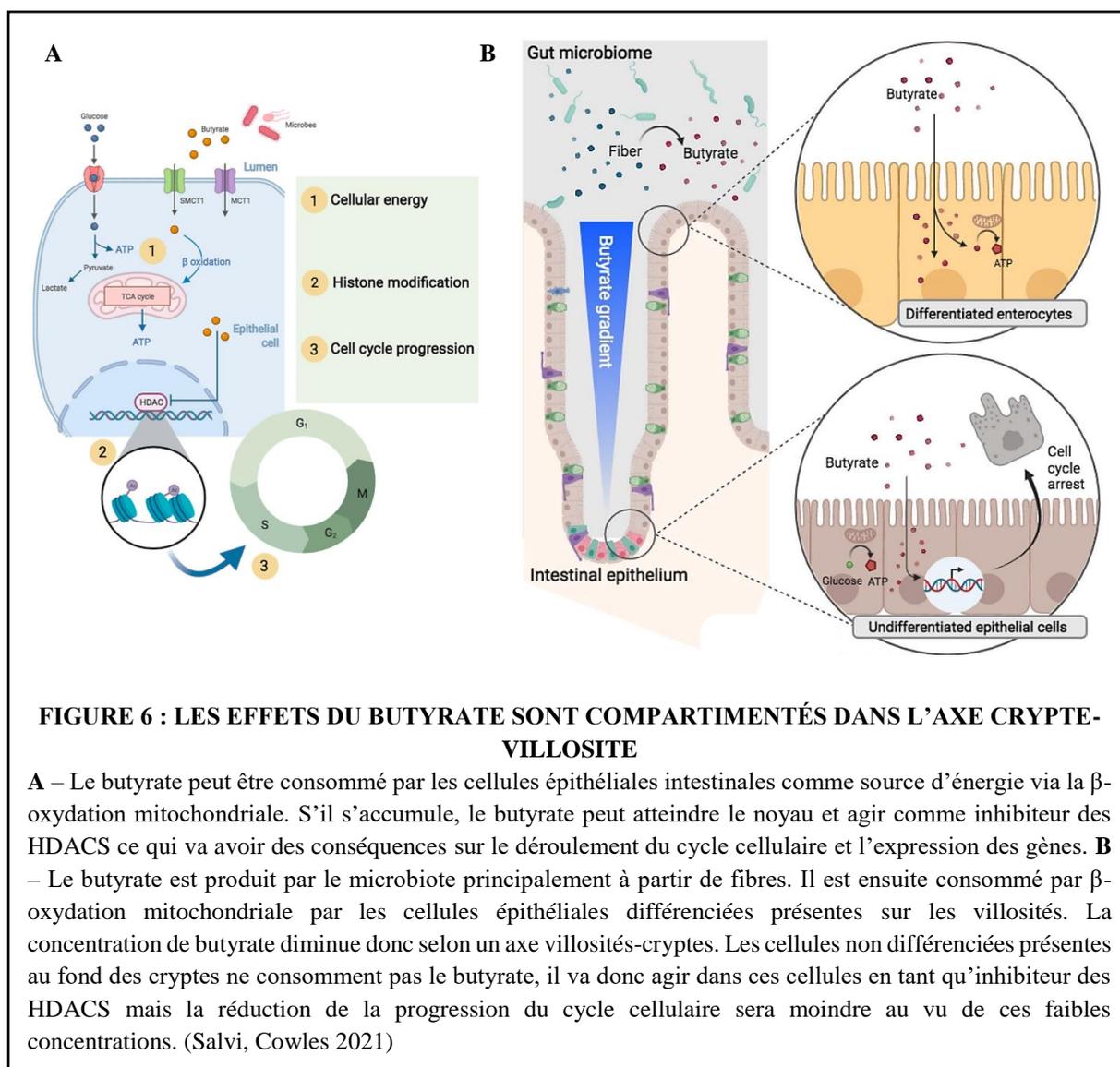
Les effets du butyrate sont largement étudiés chez l'homme et la souris. Il a été montré sur des lignées cellulaires humaines Caco-2 que le butyrate induit une augmentation de l'apoptose et une diminution de la prolifération cellulaire qui est concentration-dépendante (Peng et al. 2007) et cette diminution de la prolifération est également retrouvée sur des cellules murines et humaines en monocouches issues d'entéroïdes avec une diminution de l'expression du gène LGR5 et une diminution du marquage des cellules à l'EdU (Pearce et al. 2020). Le butyrate est connu notamment pour se lier à des récepteurs d'acides gras volatiles (GPR41, GPR43, GPR109) (Salvi, Cowles 2021), qui sont des récepteurs exprimés par les cellules épithéliales et qui, lorsqu'ils sont activés par le butyrate, vont induire notamment la production de cytokines telles que l'IL18. Cela permet au butyrate d'induire un effet protecteur local contre l'inflammation car l'IL18 est impliquée dans le maintien de l'homéostasie intestinale (Dou et al. 2020). Il a également été montré sur des lignées cellulaires humaines Caco-2 que le butyrate augmente l'expression de TNF $\alpha$  (Feng et al. 2018), également impliqué dans des mécanismes de régulation de la réponse immunitaire. Le butyrate induit une diminution de la perméabilité épithéliale intestinale que l'on peut voir grâce à une augmentation de la TEER sur des cellules murines et humaines en monocouches issues d'entéroïdes (Pearce et al. 2020) ainsi que sur des lignées cellulaires humaines Caco-2 (Peng et al. 2007; Feng et al. 2018), mais à partir de 8 mM, le butyrate induit au contraire une diminution de la TEER (Peng et al. 2007). Une étude sur des lignées cellulaires humaines Caco-2 a montré que l'amélioration de la perméabilité induite par le butyrate est due à une activation de la voie de signalisation Akt, qui permet une augmentation de l'expression du gène CLDN3 codant pour la protéine de jonction serrée claudine 3 (Feng et al. 2018). La différenciation des cellules est également impactée par le butyrate : il y a une augmentation de l'expression des gènes MUC3 et MUC5B qui sont marqueurs des cellules en gobelet sur une lignée cellulaire humaine HT-29 (Gaudier et al. 2004), il y a également une augmentation de l'expression des gènes CHGA et PYY, marqueur des cellules entéroendocrines, du gène LYZ, marqueur des cellules de Paneth et du gène ALPI, marqueur des entérocytes (Pearce et al. 2020).

Les effets du butyrate ont également été étudiés sur des modèles d'entéroïdes 3D humains et murins, qui sont des cultures de cellules épithéliales intestinales primaires permettant d'obtenir un modèle complexe de l'intestin (Pearce et al. 2020). Le butyrate induit une augmentation de l'expression des gènes CHGA, PYY, LYZ et ALPI (Pearce et al. 2020). En ce qui concerne les cellules en gobelet, étudiées ici grâce au gène MUC2, son expression est augmentée chez l'homme mais diminuée chez la souris (Pearce et al. 2020), tandis que l'on a une diminution de l'expression du gène TFF3 chez les deux espèces, ce qui montre qu'il peut y avoir des

différences importantes dans le profil d'expression génique entre les différentes espèces en réponse au butyrate. Dans ce modèle d'entéroïdes 3D, le gène LGR5 et un marquage des cellules à l'EdU montrent une diminution de la prolifération cellulaire (Pearce et al. 2020). Le butyrate induit une augmentation de l'expression des gènes REG3 $\beta$  et REG3 $\gamma$ , marqueurs des cellules de Paneth, et une augmentation de l'expression du gène TJP1 codant pour la protéine de jonction serrée la protéine zonula-occludens 1 (ZO-1) sur les entéroïdes 3D (Pearce et al. 2020).

Le butyrate est connu pour modifier l'expression de certains gènes via l'inhibition des histones désacétylases (HDACs), qui sont des enzymes induisant des modifications épigénétiques (Salvi, Cowles 2021) (Figure 6A). Cependant les effets du butyrate sont compartimentés : les entérocytes différenciés présents sur les villosités vont l'utiliser grâce à la  $\beta$ -oxydation, alors que cette capacité est réduite dans les cellules souches (Salvi, Cowles 2021) (Figure 6B). Le butyrate peut donc s'accumuler dans le cytoplasme des cellules souches ce qui permet l'inhibition des HDACs, responsable d'une réduction de la prolifération (Salvi, Cowles 2021) (Figure 6B). Cependant l'organisation de l'épithélium intestinal en cryptes et villosités permet la mise en place d'un gradient de concentration en butyrate : les cellules présentes sur les villosités l'utilisent via la  $\beta$ -oxydation, donc les cellules souches se trouvant au fond des cryptes sont soumises à une concentration plus faible en butyrate, et il a donc peu d'impact sur leur prolifération (Salvi, Cowles 2021) (Figure 6B). Ces différences dans l'utilisation du butyrate en fonction de la zone du relief expliquent les différences qui sont observées entre les effets du butyrate sur des modèles 2D ou 3D. Le gradient de butyrate confère une protection aux cellules souches qui peut être mise à mal lors de dommages à la structure de l'épithélium intestinal, comme ceux causés par le DON.

Les effets du butyrate ont également été étudiés sur les cellules épithéliales intestinales de porc en utilisant comme modèle des lignées cellulaires porcines IPEC-J2. Il a été montré que, de même que chez l'homme et la souris, le butyrate induit une augmentation de la TEER associée à une diminution de la perméabilité au FITC-dextran (Yan, Ajuwon 2017). Il y a également une augmentation de l'expression des gènes codant pour les protéines de jonctions serrées claudine 1, occludine et ZO-1 (Li et al. 2022; Saleri et al. 2022) mais pas dans toutes les études réalisées où il y a au contraire une augmentation de l'expression des claudines 3 et 4 (Yan, Ajuwon 2017). Le butyrate augmente également l'expression de TNF $\alpha$  sur des cellules porcines IPEC-J2 (Yan, Ajuwon 2017; Saleri et al. 2022). En ce qui concerne l'expression des gènes codant pour les cytokines, les profils d'expression varient d'une étude à l'autre avec par exemple une diminution de l'IL8 (Dou et al. 2020) lors de l'ajout de 4 mM butyrate dans le milieu de culture



**FIGURE 6 : LES EFFETS DU BUTYRATE SONT COMPARTIMENTÉS DANS L'AXE CRYPTE-VILLOSITE**

**A** – Le butyrate peut être consommé par les cellules épithéliales intestinales comme source d'énergie via la  $\beta$ -oxydation mitochondriale. S'il s'accumule, le butyrate peut atteindre le noyau et agir comme inhibiteur des HDACS ce qui va avoir des conséquences sur le déroulement du cycle cellulaire et l'expression des gènes. **B** – Le butyrate est produit par le microbiote principalement à partir de fibres. Il est ensuite consommé par  $\beta$ -oxydation mitochondriale par les cellules épithéliales différenciées présentes sur les villosités. La concentration de butyrate diminue donc selon un axe villosités-cryptes. Les cellules non différenciées présentes au fond des cryptes ne consomment pas le butyrate, il va donc agir dans ces cellules en tant qu'inhibiteur des HDACS mais la réduction de la progression du cycle cellulaire sera moindre au vu de ces faibles concentrations. (Salvi, Cowles 2021)

alors que d'autres études montrent que l'expression d'IL8 est augmentée avec l'ajout de 1 mM butyrate (Yan, Ajuwon 2017) sur des cellules IPEC-J2 dans les 2 cas. Les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (TLR) voient également leur expression modifiée par le butyrate : on retrouve une augmentation du gène TLR2 (Dou et al. 2020) ainsi qu'une diminution de TLR3 et 4 (Dou et al. 2020; Yan, Ajuwon 2017), tandis que l'expression de MYD88 n'est pas impactée (Dou et al. 2020). Un autre facteur impliqué dans la réponse immunitaire est le gène NF $\kappa$ B dont l'expression est parfois diminuée (Saleri et al. 2022) et parfois augmentée (Dou et al. 2020). Le butyrate modifie donc la réponse inflammatoire des cellules IPEC-J2 mais les facteurs impliqués varient en fonction des études, possiblement en lien avec la concentration de butyrate utilisée. Le butyrate augmente également l'expression des gènes codant pour des peptides antimicrobiens : PBD1 (Saleri et al. 2022), PBD3 et pEP2C (Dou et al. 2020). Le butyrate permettrait également l'activation de la voie de signalisation MAPK (Yan, Ajuwon 2017). Le butyrate permet d'améliorer le fonctionnement mitochondrial

car il augmente l'expression des gènes TFAM, NRF1 et PGC1 $\alpha$ , impliqués dans la biogenèse mitochondriale (Li et al. 2022). Enfin, il a également été montré chez le porc que des concentrations en butyrate trop élevées peuvent au contraire avoir des effets délétères, à partir de 5 mM pour l'expression de l'occludine par exemple (Saleri et al. 2022) ou bien une réduction de la viabilité cellulaire à partir de 4 mM (Dou et al. 2020). Les effets du butyrate sur des organoïdes du côlon de porcs ont également été étudiés (Beaumont et al. 2023). Il a été montré que le butyrate induit, de même que pour les lignées cellulaires porcines (Yan, Ajuwon 2017; Li et al. 2022; Saleri et al. 2022), une augmentation de la TEER associée à une augmentation de l'expression de l'occludine (Beaumont et al. 2023). De même que pour les entéroïdes humains et murins (Pearce et al. 2020), on retrouve une diminution de la prolifération avec le butyrate qui se traduit ici par une diminution de l'expression du gène OLFM4. L'effet opposé aux lignées cellulaires porcines est retrouvé pour la différenciation cellulaire (Pearce et al. 2020) puisqu'il y a une augmentation dans les organoïdes porcins de l'expression des gènes CHGA et LYZ, avec également FABP1, FABP6, PIGR et NHE3 (Beaumont et al. 2023). Le butyrate induit également une diminution de l'expression des gènes MUC1 et MUC2 (Beaumont et al. 2023) correspondant aux résultats retrouvés sur les entéroïdes 3D murins et non humains (Pearce et al. 2020).

Des études ont également étudié les effets du butyrate sur les porcs *in vivo*. Lors de l'ajout de butyrate de sodium dans la ration, qu'il soit sous forme enrobée d'une couche lipidique ou non pour retarder son absorption, il a été montré que le butyrate permet d'augmenter le gain moyen quotidien (GMQ) des porcs (Feng et al. 2018; Liu et al. 2023; Wang et al. 2018) et que du butyrate non enrobé a permis de diminuer les symptômes chez les porcelets atteints de diarrhées (Feng et al. 2018). La morphologie de l'intestin est également modifiée par le butyrate de sodium enrobé avec une augmentation de la taille des villosités et une diminution de celle des cryptes (Liu et al. 2023), de même du butyrate de calcium enrobé a induit une augmentation du nombre de plis transversaux mais qui au contraire n'est pas associée à une augmentation de la taille des villosités (Claus, Günthner, Letzguss 2007). L'apport en butyrate de sodium enrobé a permis d'améliorer la perméabilité avec une augmentation de la TEER associée à une diminution de la perméabilité au FITC-dextran sur des explants de jéjunum (Wang et al. 2018), ou bien il y a un faible ratio lactulose-mannitol dans les urines des porcs avec du sodium butyrate non enrobé (Feng et al. 2018), ce qui correspond à une faible perméabilité de l'épithélium intestinal. L'amélioration de la perméabilité induite par du butyrate de sodium enrobé butyrate est accompagnée d'une augmentation de l'expression des gènes codant pour des protéines de jonctions serrées claudine 1 (dans le duodénum et l'iléon) (Liu et al. 2023),

cludine 3, occludine (dans l'iléon et le côlon), ainsi que ZO-1 (dans le côlon) avec du butyrate de sodium non enrobé (Feng et al. 2018). Le butyrate de sodium enrobé induit également une augmentation de l'expression des gènes ITGB1, une intégrine, ainsi que le gène PKC qui est impliqué dans l'assemblage des jonctions serrées contenant de l'occludine (Liu et al. 2023). Le butyrate de sodium enrobé stimule la différenciation cellulaire avec une augmentation de l'expression du gène MUC1 (Liu et al. 2023). On retrouve une augmentation de l'activation de la voie de signalisation MAPK avec du butyrate de sodium non enrobé (Feng et al. 2018) de même que dans les modèles de lignées cellulaires porcines (Yan, Ajuwon 2017). Enfin, le butyrate de sodium, enrobé ou non, induit une réduction de la réponse immunitaire avec la diminution de l'expression des gènes codant pour TNF $\alpha$  (Feng et al. 2018; Wang et al. 2018) et le butyrate de sodium enrobé induit une diminution de l'expression du gène codant pour IL6 (Wang et al. 2018).

Le butyrate possède donc des effets protecteurs de l'épithélium intestinal, jusqu'à une concentration seuil dépendante du modèle, grâce à une diminution de la perméabilité intestinale, une augmentation de l'expression des gènes codant pour des protéines de jonctions, une diminution de la prolifération, une augmentation de la différenciation, la mise en place d'une réponse immunitaire innée épithéliale et une amélioration du métabolisme mitochondrial.

### **E. Effets combinés du butyrate et du déoxynivalénol**

Dans ce contexte, le butyrate pourrait donc réduire les effets délétères du DON, aux vues de leurs effets respectifs opposés sur l'épithélium intestinal. Il a été montré que chez des souris (Lin et al. 2020) ainsi que dans le côlon de porcelets (Recharla et al. 2022), il y a une diminution de la concentration en butyrate retrouvée dans la lumière intestinale suite à une exposition au DON. Il existerait donc des interactions entre le DON et le butyrate au niveau du microbiote intestinal et il serait intéressant d'étudier les interactions entre ces deux composés au niveau des cellules de l'épithélium intestinal, encore peu explorées à ce jour.

Parmi les études s'intéressant à la combinaison du butyrate et du DON, certaines se sont concentrées sur les effets observés au niveau du foie, lieu de métabolisation du DON (Payros et al. 2016). Une étude a montré que le DON induit une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la production de ROS et dans la voie pro-inflammatoire du TNF $\alpha$  dans le foie de porcelets nourris avec une ration contaminée par du DON (Zong et al. 2023). Il a été montré que la complémentation de la ration en butyrate permet d'atténuer les effets du DON dans le foie avec notamment une augmentation de l'expression des gènes GPX4 et NFE2L2 qui ont des

rôles protecteurs contre le stress oxydant, et une diminution de l'expression des gènes IL6, IL8, IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IFN $\beta$ , et TNF $\alpha$ , impliqués dans la réponse immunitaire innée (Zong et al. 2023). Les effets du DON sont dus à des modifications d'acétylation des gènes concernés, et l'acétylation est rétablie grâce aux effets du butyrate en complément du DON (Zong et al. 2023). Il a également été montré dans le foie de porcelets que le butyrate s'oppose aux effets du DON via l'inhibition des HDACs, un autres mécanisme épigénétique (Zong et al. 2022) : le butyrate réduit les effets du DON sur l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol. La prévention des effets du DON par une complémentation en butyrate a donc été prouvée au niveau du foie.

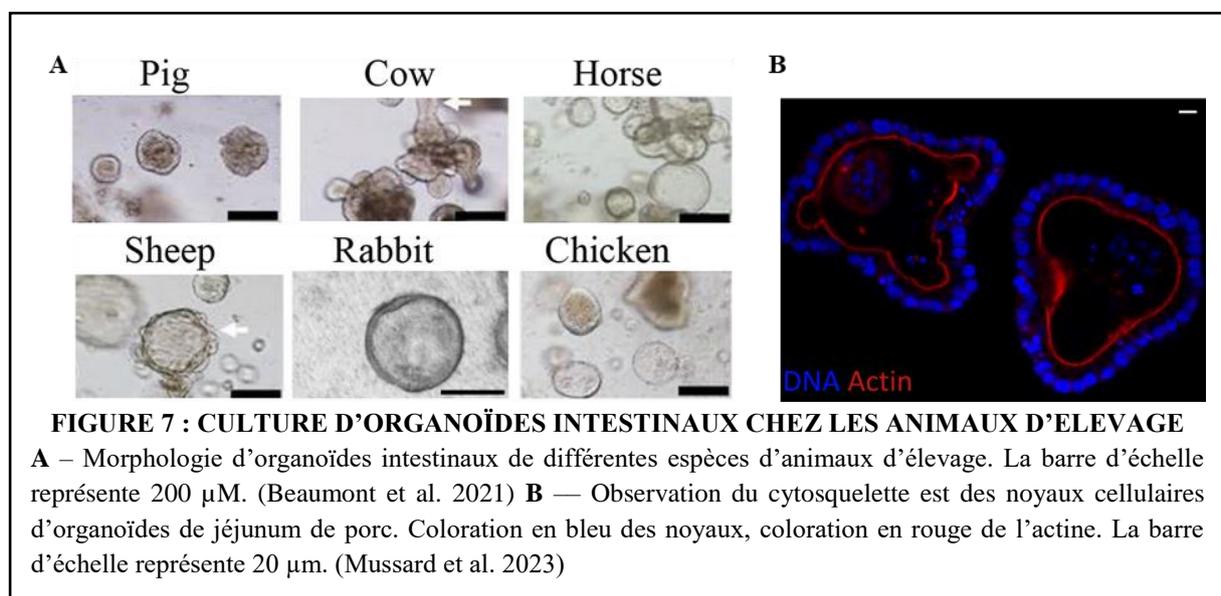
En ce qui concerne l'intestin, plusieurs études ont mis en avant des traitements (probiotiques, resveratol, lactoferrine) permettant de réduire les effets délétères du DON sur l'épithélium intestinal des porcs, des volailles et des souris (Qiu et al. 2021; Wu et al. 2018; Hu et al. 2022). Ces études suggèrent une efficacité de ces traitements via une augmentation de la concentration de butyrate dans l'intestin. Le rôle du butyrate a alors pu être confirmé sur des lignées cellulaires épithéliales intestinales HT-29 et également *in vivo* sur des souris chez qui il a permis d'améliorer la structure de l'intestin et d'augmenter la production de mucus qui sont altérées par le DON (Lin et al. 2020). Il a été montré sur des cellules HT-29-MTX sécrétrices de mucus traitées préalablement avec 50  $\mu$ M de DON que l'administration de butyrate dans des concentrations comprises entre 5 et 10 mM permet une amélioration de la fonction de barrière épithéliale (Nielsen et al. 2018). En effet, le butyrate à ces concentrations a permis une augmentation de la TEER ainsi qu'une augmentation de l'expression de la mucine 2. Il a été montré sur des cellules jéjunales de porc IPEC-J2 qu'une concentration de 0,5 mM de butyrate permet de s'opposer aux effets du DON à 1  $\mu$ M en améliorant la perméabilité intestinale, évaluée via l'expression du gène codant pour la protéine de jonction serrée claudine 4 (Wang et al. 2020). Enfin, une diminution de la fragmentation et de la destruction des mitochondries ainsi qu'une augmentation du potentiel de membrane lors de l'ajout du butyrate au DON ont été observées sur des cellules IPEC-J2 (Xue et al. 2023).

Chez le porc *in vivo*, les effets du butyrate sur l'épithélium intestinal ne sont pas encore bien caractérisés et ils semblent n'avoir été que peu étudiés en combinaison avec le DON. Il a tout de même été montré que le butyrate permet de rétablir l'expression des gènes codant pour l'occludine (Xue et al. 2023), la claudine 4 (Xue et al. 2023; Wang et al. 2020) et ZO-1 (Xue et al. 2023; Wang et al. 2020) dans le côlon qui ont été réduites par le DON. Le butyrate a également induit une augmentation de la production de peptides antimicrobiens, la  $\beta$ -défensine, dans le côlon qui a été réduite par le DON (Wang et al. 2020). Il a aussi été montré que

l'expression des gènes codant pour PCK2, IDH2 et PGC1 $\alpha$ , qui sont marqueurs du bon fonctionnement du métabolisme énergétique et de la biogenèse mitochondriales, est réduite lors d'une exposition des porcelets au DON et son expression est rétablie lors d'une complémentation en butyrate (Xue et al. 2023), et l'augmentation de l'expression du gène PCK2 est corrélée à l'augmentation des gènes codant pour des protéines de jonctions serrées (Xue et al. 2023). Il est donc intéressant d'étudier dans quelle mesure le butyrate peut-il être bénéfique à la gestion d'une intoxication au DON chez les porcs et d'explorer les mécanismes potentiellement impliqués.

### F. Présentation des organoïdes intestinaux de porcelets

Les modèles habituellement utilisés pour étudier la barrière épithéliale intestinale présentent de nombreux défauts. En effet, les cultures réalisées à partir de lignées cellulaires ne représentent pas la diversité cellulaire de l'épithélium intestinal et leur profil d'expression génique est restreint et peu ressemblant à celui de cellules *in vivo* (van der Hee et al. 2020). Il existe également des cultures *ex vivo*, qui sont de meilleurs modèles que les lignées cellulaires mais elles ne sont pas viables dans le temps (Randall, Turton, Foster 2011) et nécessitent l'utilisation de nouveaux animaux vivants pour chaque culture.

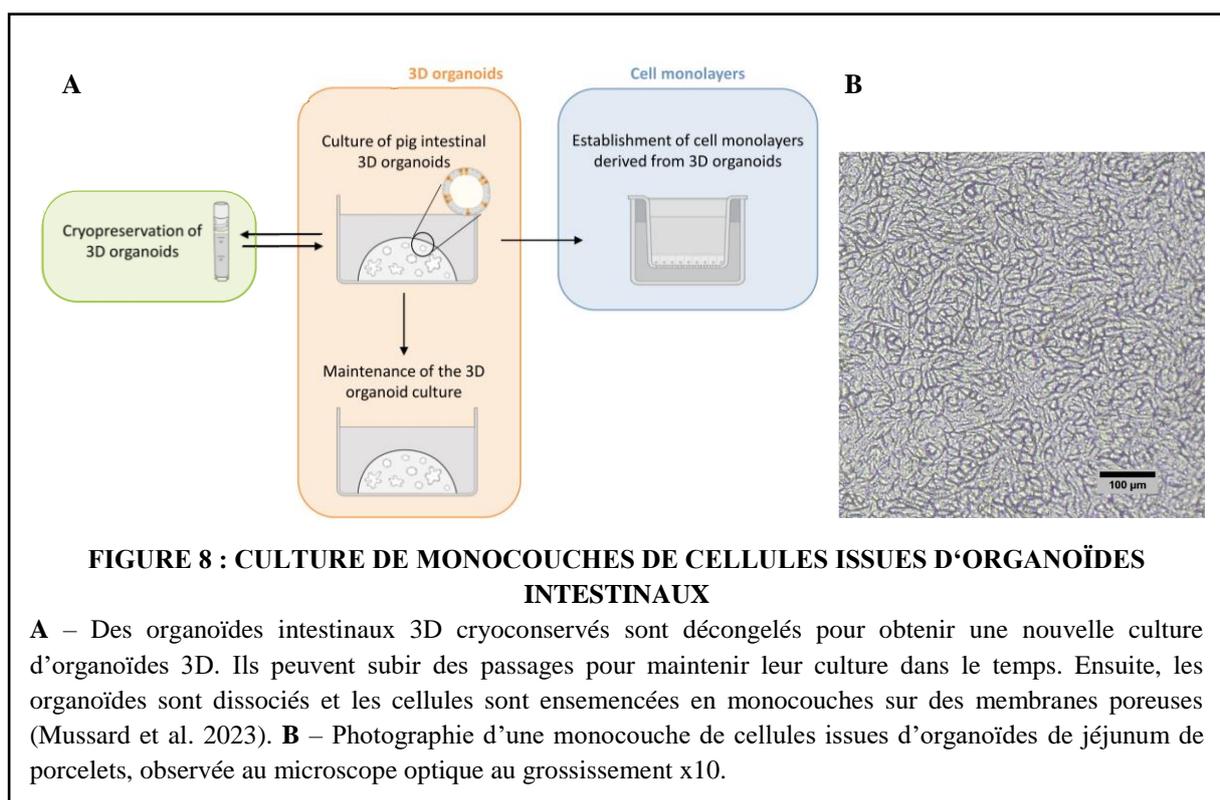


C'est dans ce contexte que le modèle des organoïdes intestinaux a été développé. Ce sont des cultures de cellules épithéliales autoorganisées en 3D (Figure 7), dérivées de cellules souches qui vont acquérir une organisation structurale et fonctionnelle similaire à celle de l'organe d'origine pour certains aspects. Des études antérieures ont permis d'adapter la culture d'organoïdes pour différentes espèces d'animaux d'élevage (Beaumont et al. 2021). Parmi eux,

les organoïdes porcins sont bien caractérisés et représentent un modèle adéquat pour caractériser les interactions entre le butyrate et le DON. Les organoïdes sont obtenus à partir de cryptes intestinales qui sont placées dans du Matrigel<sup>®</sup>, utilisé comme matrice pour rendre la croissance en 3D possible (Beaumont et al. 2021). Ces cryptes présentes dans le Matrigel<sup>®</sup> sont ensuite recouvertes d'un milieu de culture contenant différents facteurs qui miment la niche des cellules souches : des facteurs de croissance épidermique (EGF) stimulant la prolifération, un des facteurs de la voie Wnt qui est R-spondin stimulant la prolifération, un inhibiteur de la voie BMP qui est Noggin empêchant l'inhibition de la prolifération, et enfin un inhibiteur de la voie ROCK qui est Y-27632, nécessaire seulement lors des passages d'organoïdes car il empêche l'anoïkis des cellules isolées (Sato et al. 2009). Ces facteurs ne sont souvent pas disponibles pour les espèces d'élevage, mais des facteurs orthologues murins ou humains permettent la culture des organoïdes de porcs (Beaumont et al. 2021). Pour pallier à ce manque de facteurs commercialisés, il est possible d'utiliser de l'Intesticult<sup>®</sup> qui est un milieu de culture commercialisé contenant tous les facteurs nécessaires à la culture des organoïdes humains initialement, mais efficace pour des organoïdes porcins (Beaumont et al. 2021).

L'utilisation des organoïdes est intéressante car ils permettent un maintien de la diversité cellulaire épithéliale (Figure 2) et qui sont viables dans le temps grâce à des passages répétés à partir des mêmes cellules souches (van der Hee et al. 2020), ce qui consiste à les dissocier et à les ensemercer à nouveau dans du Matrigel<sup>®</sup> (Beaumont et al. 2021). Ces structures présentent des profils d'expression génique plus ressemblants à ceux observés *in vivo*, avec environ 80% de gènes spécifiques à l'épithélium jéjunal exprimé également dans les organoïdes, en comparaison aux lignées cellulaires, chez qui seulement 32% des gènes spécifiques à l'épithélium jéjunal sont exprimés (van der Hee et al. 2020). Les organoïdes permettent de reproduire de façon fiable le profil d'expression génique correspondant aux fonctions de transports des nutriments et des processus métaboliques, comme tout particulièrement le métabolisme des acides gras tel que le butyrate (van der Hee et al. 2020). Bien qu'il y ait des changements dans l'expression de certains gènes au fil des passages ils conservent un profil d'expression proche des tissus *in vivo* (van der Hee et al. 2020). Cependant toutes les fonctions ne sont pas représentatives de celles d'un tissu *in vivo* puisque par exemple les voies de signalisation liées à la matrice extracellulaire (MEC) ne seront pas retrouvées dans les organoïdes. En effet le Matrigel<sup>®</sup> ne semble pas remplacer la totalité des fonctions de la MEC (van der Hee et al. 2020). Le microenvironnement est également absent des cultures d'organoïdes où on ne retrouve pas les cellules immunitaires, le système nerveux, les affluences hormonales ou encore le microbiote.

Les organoïdes 3D possèdent un pôle apical orienté vers leur centre, rendant seulement le pôle basolatéral accessible pour les composés présents dans le milieu. Or notre objectif est d'administrer le DON et le butyrate via le pôle apical afin de mimer l'ingestion de ces composés par les porcs (Beaumont et al. 2021). Il est possible d'utiliser des micro-injections afin d'administrer les composés souhaités au pôle apical des cellules mais cette technique demande du matériel couteux ainsi que beaucoup de temps et d'expérience afin d'obtenir des injections reproductibles (Blutt 2018). Une méthode plus simple est d'inverser la polarisation des organoïdes en retirant la MEC, mais il a été montré que le protocole permet d'inverser 0 à 80% des organoïdes présent ce qui est trop aléatoire pour être satisfaisant (Li et al. 2020). La méthode que nous allons alors utiliser est le passage des organoïdes en monocouches cellulaires qui permettent alors une étude du rôle de barrière de l'épithélium (Mussard et al. 2023) (Figure 8). Ce modèle en 2D permet en effet de retrouver la diversité cellulaire de l'épithélium et permet une administration apicale des composés à étudier, ce qui reflète l'exposition physiologique aux métabolites bactériens et aux toxines alimentaires (Mussard et al. 2023).



Les effets du délétères du DON et les effets bénéfiques du butyrate sur la barrière épithéliale intestinale ont été largement étudiés sur des lignées cellulaires et *in vivo* mais les effets de l'administration conjointe de butyrate et de DON a été très peu étudiée. L'objectif de ce travail était donc de caractériser les effets du butyrate et du DON sur le modèle des monocouches de cellules d'organoïdes d'intestin de porcelets.

# I. Matériel et méthode

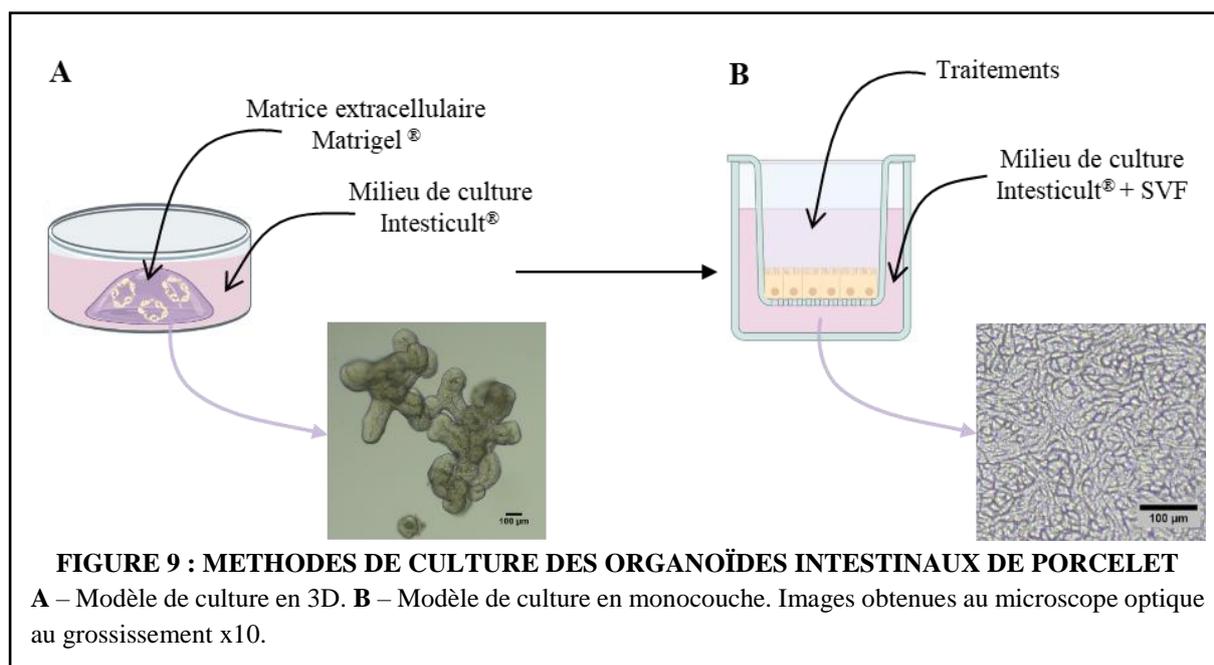
## A. Culture des organoïdes

Les organoïdes utilisés ont été obtenus à partir d'organoïdes de jéjunum cryopréservés de 7 porcelets de 21 jours (avant le début du sevrage) différents. Chaque porcelet a été utilisé pour former un stock de plusieurs échantillons d'organoïdes cryopréservés qui ont été renouvelés par des passages. Pour chaque expérience réalisée dans notre étude, des organoïdes de différents porcs ont été décongelés et utilisés selon le protocole détaillé qui a été publié (Mussard et al. 2023).

Les organoïdes décongelés ont été centrifugés et ont été mis en culture dans des plaques de 48 puits dans un dôme de Matrigel<sup>®</sup>, une matrice extracellulaire permettant la formation d'une structure en 3 dimensions (Figure 9A). Les dômes ont été recouverts d'Intesticult<sup>®</sup> : un milieu de culture commercial contenant notamment les activateurs de la voie Wnt et les inhibiteurs de la voie BMP nécessaires à la prolifération des cellules souches (Gehart, Clevers 2019). Après 48 à 72 heures de culture, les organoïdes décongelés ont été dissociés par pipetage et par l'utilisation de TrypLE<sup>®</sup> – une protéase fongique recombinante de type trypsine – à 37°C. La dissociation a été stoppée par l'ajout de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) froid contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF). Après centrifugation, les cellules dissociées ont été comptées et le nombre souhaité (3000 cellules / puits) a été mis en culture dans un nouveau dôme de 50 µL contenant 2 tiers de Matrigel<sup>®</sup> et 1 tier de DMEM avant l'ajout d'Intesticult<sup>®</sup>, renouvelé au bout de 48 heures.

Le passage d'organoïdes 3D en monocouches a été réalisé après 120 heures de culture. Ils ont été dissociés par pipetage et par l'utilisation de TrypLE<sup>®</sup> contenant 10 µM de Y-27632 (Sato et al. 2009) – à 37°C. La dissociation a été stoppée par l'ajout de DMEM froid contenant 10 % de SVF. Après centrifugation, les cellules dissociées ont été comptées et le nombre souhaité ( $2,5 \cdot 10^5$  cellules / insert) a été resuspendu dans un milieu de culture apical composé à 80% d'Intesticult<sup>®</sup>, 20% de SVF et 10 µM de Y-27632. Les cellules ont ensuite été mises en culture dans une plaque de 24 puits avec des inserts contenant une membrane poreuse prétraitée 2 heures à 37°C avec du collagène de type IV à 50 µg/mL dans du PBS. Le milieu de culture basal, de 770 µL, était identique au milieu de culture apical, de 400 µL. Les cellules formaient une monocouche sur la membrane poreuse (Figure 9B). Le protocole complet de culture des organoïdes et des monocouches est disponible en Annexe 2. Au bout de 24 heures le milieu de culture apical a été changé en fonction des protocoles décrits ci-dessous permettant d'administrer différents traitements dilués dans du PBS sur les cellules. Le milieu de culture

basal était toujours changé en même temps que le milieu de culture apical et à partir de 24 heures sa composition était de 80% d'Intesticult® et de 20% de SVF.



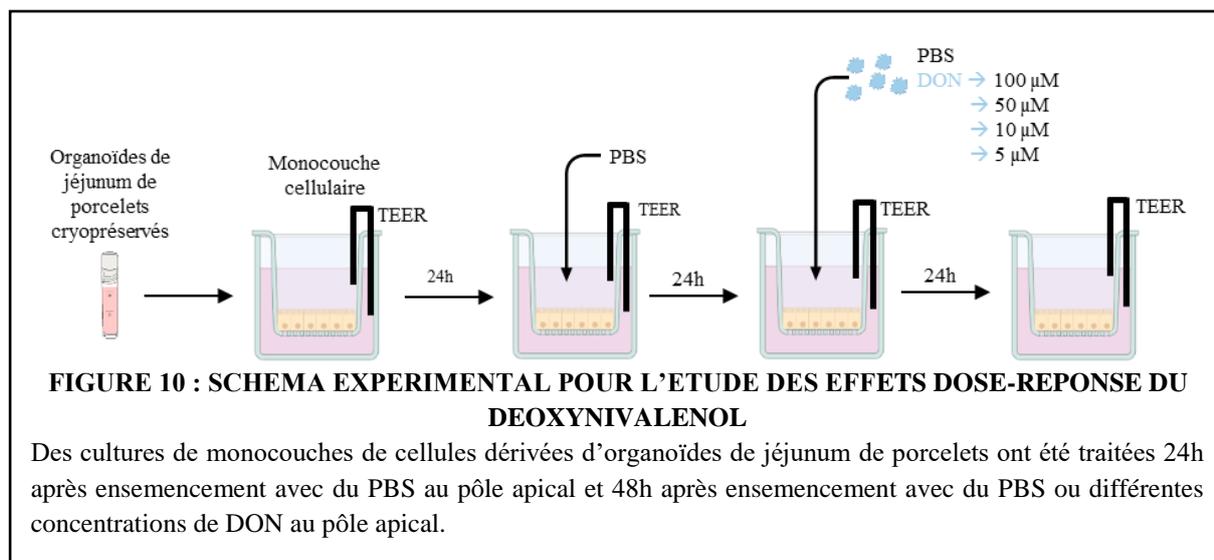
### 1. Etude des effets dose-réponse du déoxynivalénol

L'objectif de cette expérience était de déterminer la concentration de DON à utiliser pour observer un effet sur notre modèle de monocouches dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets sans qu'il n'y ait de cytotoxicité.

Le DON est habituellement utilisé à la concentration de 10 µM sur des lignées cellulaires classiques sur lesquelles il a alors des effets sur la morphologie des cellules sans affecter leur viabilité (Pinton, Oswald 2014), et en dessous de 10 µM sur des explants intestinaux pour lesquels on retrouve de la nécrose au-delà de cette concentration (Kolf-Clauw et al. 2009). Nous avons donc testé une gamme de concentrations de DON allant de 5 µM à 100 µM, car il est connu que les cellules épithéliales différenciées comme celles présentes dans les organoïdes sont moins sensibles au DON que les cellules immatures, majoritaires dans les modèles de lignées cellulaires (Luo et al. 2021).

Les inserts ont été placés dans un cellZscope permettant de mesurer la TEER en continu. Le milieu apical a été renouvelé 24 heures après le passage des organoïdes en 2D par du PBS (Figure 10). A 48 heures, le milieu apical a été renouvelé par du PBS contenant différentes concentrations de DON : 0 (utilisé comme témoin), 5, 10, 50 et 100 µM. A 72 heures, la perméabilité transépithéliale a été mesurée par l'utilisation du FITC-dextran 4 kDa comme

décrit ci-dessous puis les cellules ont été utilisées pour l'obtention de lysats protéiques conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  ou bien les cellules ont subi une extraction d'ARN.

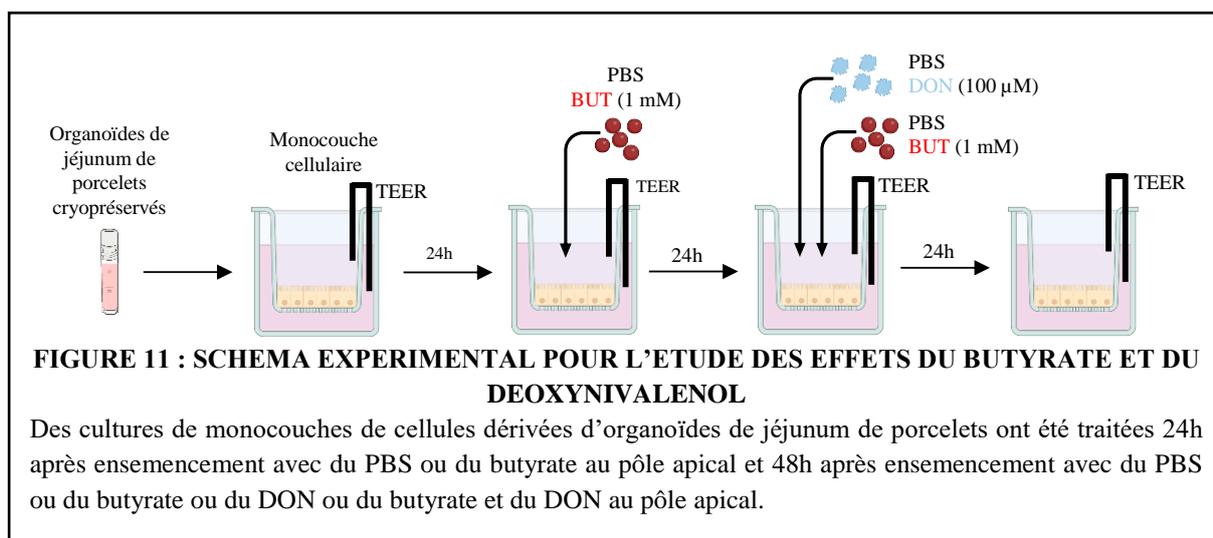


## 2. Etude des effets du butyrate et du déoxyvalénol

L'objectif de cette expérience était d'étudier les effets du butyrate et du DON, ainsi que les effets de l'association de ces deux composés sur notre modèle de monocouches dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets.

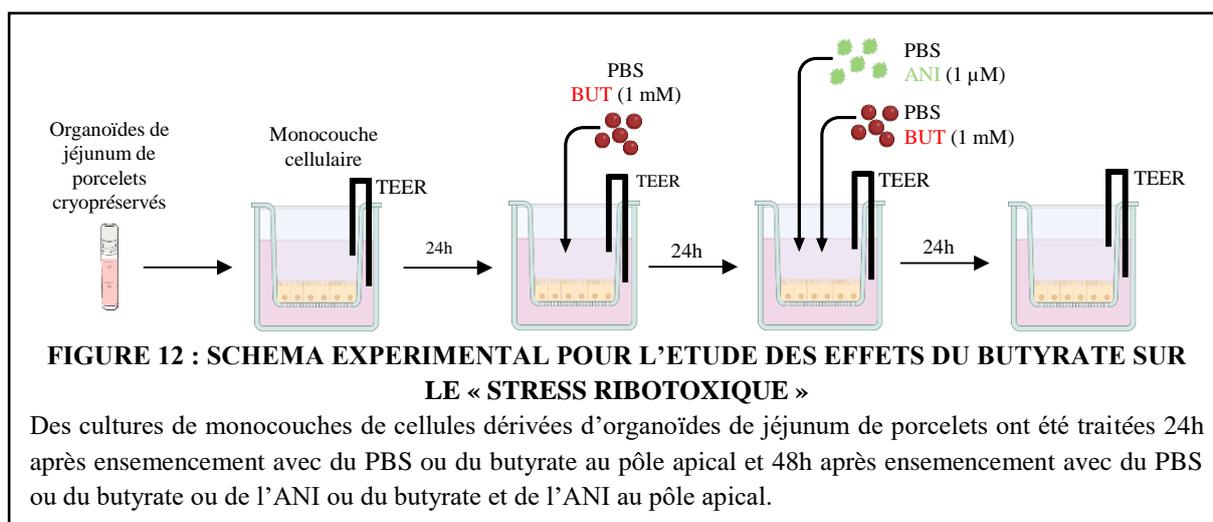
Les inserts ont été placés dans un cellZscope permettant de mesurer la TEER en continu. Le milieu apical a été renouvelé 24 heures après le passage des organoïdes en 2D (Figure 11) par du PBS utilisé seul comme témoin, ou contenant du butyrate à une concentration de 1 mM (Pearce et al. 2020; Beaumont et al. 2023). A 48 heures, le milieu apical a été renouvelé à l'identique avec ou non l'ajout de DON à une concentration de 100  $\mu\text{M}$ , comme déterminé par le protocole précédent (Effets dose-réponse du DON). Quatre conditions différentes sont donc étudiées : PBS (contrôle), butyrate, DON et l'association du butyrate et du DON. A 72 heures, les milieux de culture ont été récupérés et congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les monocouches ont eu différentes utilisations possibles par la suite :

- Mesure de la perméabilité transépithéliale par l'utilisation du FITC-dextran 4 kDa puis les cellules ont été utilisées pour l'obtention de lysats protéiques conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  ;
- Extraction d'ARN conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  ;
- Fixation pour une analyse par microscopie confocale ;
- Fixation pour une analyse par microscopie électronique.



### 3. Etude des effets du butyrate sur le « stress ribotoxique »

L'objectif de cette expérience était d'étudier les effets du traitement préventif de butyrate sur les effets causés par la ribotoxicité sur notre modèle de monocouches dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets.



Les inserts ont été placés dans un cellZscope permettant de mesurer la TEER en continu. Le milieu apical a été renouvelé 24 heures après le passage des organoïdes en 2D (Figure 12) avec du PBS utilisé seul comme témoin ou contenant du butyrate à une concentration de 1 mM. A 48 heures, les milieux apicaux ont été renouvelés à l'identique avec ou non l'ajout d'anisomycine (ANI) à 1  $\mu$ M (déterminé par une expérience préalable, données non présentées). L'ANI est un antibiotique produit par la bactérie *Streptomyces griseolus* et est une ribotoxine couramment utilisée pour évaluer les effets dus à l'altération du fonctionnement des ribosomes (Garofalo et al. 2022). Quatre conditions différentes sont donc étudiées : PBS (contrôle),

butyrate, ANI et l'association du butyrate et de l'ANI. A 72 heures, les milieux de culture ont été récupérés et congelés à -20°C. Certaines cellules ont subi une extraction d'ARN et ils ont été conservés à -80°C. D'autres monocouches ont été utilisées pour mesurer la perméabilité transépithéliale par l'utilisation du FITC-dextran 4 kDa puis les cellules ont été utilisées pour l'obtention de lysats protéiques conservés à -80°C.

## **B. Mesure de la TEER**

La mesure de la TEER permet de quantifier la perméabilité paracellulaire épithéliale ionique, ce qui permet donc d'apprécier la qualité de la barrière intestinale qui est influencée par la confluence des cellules et par la formation des jonctions cellulaires. Il est important d'utiliser un insert ne contenant aucune cellule lors de chaque série de mesures de la TEER car cela permet de prendre en compte dans nos mesures la résistance induite par la membrane poreuse sur lesquelles reposent les cellules.

Les inserts contenant les monocouches de cellules épithéliales ont été placés dans des puits individuels dans un cellZscope. Le puits du cellZscope sert d'électrode basale et le couvercle possède une électrode apicale qui permettent de mesurer la TEER à travers l'insert. Une fois les milieux de culture ajoutés, l'appareil a été placé dans l'étuve à 37°C. Il a mesuré la TEER à intervalles réguliers, 15 minutes ici, et a enregistré toutes les données sur les 72 heures de culture.

## **C. Mesure de la perméabilité transépithéliale avec le FITC-dextran 4 kDa**

A la fin des 48 heures de traitements, les inserts ont été placés dans une plaque 24 puits avec 200 µL de FITC-dextran 4 kDa à 2,2 mg/mL de solution saline équilibrée de Hanks (HBSS) au pôle apical et 500 µL de HBSS au pôle basal. La plaque a été incubée 2 heures à 37°C, à la suite de quoi 100 µL de chaque milieu basal ont été placés en triplicat dans une plaque 96 puits noire permettant la lecture de la fluorescence. Les mesures de fluorescence ont été réalisées avec le lecteur de plaque Tecan Infinite® 200 Pro avec une excitation à 495 nm et une émission à 530 nm.

## **D. Mesure de l'activité de la LDH**

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme présente dans le cytoplasme des cellules intestinales. Elle se retrouve dans le milieu apical seulement lorsque la cellule subit des

dommages membranaires. Le kit d'analyse de la cytotoxicité CyQUANT™ a été utilisé pour quantifier la présence de LDH dans le milieu apical, et donc l'intensité des dégâts cellulaires subis par les cellules intestinales, par mesure de l'absorbance. La LDH catalyse la réaction suivante :  $\text{Lactate} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{Pyruvate} + \text{NADH}$ . Le NADH formé permet au sel de tétrazolium apporté par le kit d'être réduit en formazan qui est coloré en rouge. La lecture de l'absorbance des puits était réalisée avec le lecteur de plaque Promega™ GloMax® pour une longueur d'onde de 490 nm, qui a ensuite été remplacé par le Tecan Infinite® 200 Pro à une longueur d'onde de 495 nm.

### **E. ELISA IL8 (CXCL8)**

La méthode de dosage ELISA a été utilisée pour mesurer la quantité d'IL8 présente dans le milieu apical et basal des monocouches dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets qui ont été récupérés à la fin des 48 heures de traitement. L'anticorps de coating utilisé était le Rabbit anti Pig interleukin-8 antibody (Biorad, AHP2392) à une concentration de 3 µg/mL. Pour établir une gamme nous avons utilisé le Recombinant Pig interleukin-8 (Biorad, PPP024) à des concentrations allant de 25 à 0,390 ng/mL. Les échantillons utilisés n'ont pas été dilués avant leur utilisation. L'anticorps de détection utilisé était Rabbit anti Pig interleukin-8 antibody:Biotin (Biorad, AHP2392B) à une concentration de 0,5 µg/mL, suivi de l'utilisation de Streptavidin-HRP à une concentration de 1 µg/mL. Enfin, la révélation a été faite avec une solution de substrat TMB et du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N.

La lecture de l'absorbance a été réalisée dans un premier temps avec le lecteur de plaque Promega™ GloMax® à une longueur d'onde de 450 nm. Qui a ensuite été remplacé par le Tecan Infinite® 200 Pro à une longueur d'onde de 450 nm.

### **F. Dosage du lysozyme**

Le EnzChek® Lysozyme Assay Kit a été utilisé pour quantifier l'activité du lysozyme dans le milieu apical des monocouches dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets qui ont été récupérés à la fin des 48 heures de traitement. L'action du lysozyme permet de libérer un composé fluorescent présent sur les parois cellulaires de *Micrococcus lysodeikticus*, et cette fluorescence est proportionnelle à la quantité de lysozyme présente dans le milieu.

La lecture de la fluorescence a été réalisée avec le lecteur de plaque Promega™ GloMax® avec une excitation à 490 nm et une excitation de 510 à 570 nm.

## **G. Analyse de l'expression de gènes**

A la fin des 48 heures de traitement, les monocouches cellulaires ont été homogénéisées et stockées dans du trizol à -80°C, ce qui a permis la dégradation des cellules et l'inhibition des RNase. L'ARN a ensuite été extrait selon le protocole du kit Direct-zol<sup>TM</sup> RNA Microprep. La quantité d'ARN présente dans chaque échantillon a été dosée par spectrophotométrie à l'aide d'un Nanodrop<sup>®</sup> puis conservés à -20°C. Une réaction de rétrotranscription a ensuite été réalisée selon le protocole du kit GoScript<sup>TM</sup> Reverse Transcription Mix, Random primers, à partir de 300 ng d'ARN. Le mélange réactionnel a été incubé dans un thermocycleur selon le programme suivant : 5 minutes à 25 °C, 1 heure à 42 °C puis 15 minutes à 70 °C. Des ADNc ont été obtenus et dilués à une concentration de 5 ng/μL. Ils ont ensuite été conservés à -20°C jusqu'à la réalisation de la PCR en temps réel (qPCR) ou par qPCR en microfluidique (Fluidigm).

### **1. Par qPCR**

La qPCR a été réalisée avec un appareil QuantStudio6 dans un volume final de 5 μL. Nous avons utilisé le Power SYBR<sup>TM</sup> Green PCR Master Mix et des amorces sens et antisens adaptées aux gènes ciblés à une concentration finale de 0,5 μM. Les conditions d'amplification étaient : 10 minutes de dénaturation à 95 °C, suivi de 40 cycles de 15 secondes à 95 °C et de 1 minute à 60 °C, suivi de la réalisation d'une courbe de fusion permettant de vérifier la spécificité de la réaction.

### **2. Par qPCR en microfluidique (Fluidigm)**

La méthode du Fluidigm est une qPCR automatisée utilisant la technique de microfluidique qui nous a permis de réaliser l'étude de 95 gènes différents. Une plaque 96 puits contenant les ADNc de nos échantillons à une concentration de 5 ng/μL ainsi qu'une plaque contenant une amorce sens et une amorce antisens, à des concentrations de 20 μM chacune, dans un puits pour chaque gène étudié ont été envoyées à la plateforme Gentyane (Génotypage et séquençage en Auvergne, Genomics INRAE), à Clermont-Ferrand, pour la réalisation des mesures. A l'issue de cette qPCR, nous avons retiré les gènes de référence et les gènes pour lesquels l'expression n'a pas pu être mesurée. Nous avons donc retenu 62 gènes qui seront présentés.

## **H. Obtention de lysats protéiques**

A la fin des 48 heures de traitement, les monocouches cellulaires ont été homogénéisées et stockées à -80°C dans 50 μL d'une solution d'extraction composée d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases cOmplete<sup>TM</sup> dans du tampon de lyse RIPA (utilisation de 1 pastille pur 50 mL de solution d'extraction).

Le dosage des protéines présentes dans les échantillons a ensuite été mesurée à l'aide du BC Assay Protein Quantitation Kit™. La lecture de l'absorbance des échantillons a été réalisée avec le Tecan Infinite® 200 Pro à une absorbance de 560 nm.

## **I. Microscopie confocale**

Après 48 heures de traitement, les monocouches ont été utilisées pour différents marquages. Les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4 % pendant 20 minutes, sous agitation, pour permettre une stabilisation des structures. Les cellules ont ensuite été perméabilisées avec du triton X-100 0,2% pendant 20 minutes, sous agitation.

Certaines cellules ont été incubées avant fixation 2 heures à 37°C avec de l'EdU à 10 µM provenant du kit de prolifération cellulaire EdU Click-iT™. L'EdU est intégré à l'ADN lors de la réplication, ce qui permet de marquer les cellules en prolifération qui ont ensuite été fixées et perméabilisées. Un blocage des cellules a été réalisé grâce à du PBS/BSA 1% pendant 1 heure, sous agitation pour saturer les sites non spécifiques puis le fluorochrome Alexa 594-couplé à la sonde de détection de l'EdU a été ajouté pour détecter les cellules en prolifération.

Après fixation et perméabilisation, d'autres cellules ont été marquées avec de la phalloïdine (PHA) couplée au fluorochrome TRITC à 1 µg/mL pendant 10 minutes, permettant de marquer le cytosquelette d'actine. D'autres cellules ont été marquées avec un anticorps anti-occludine couplé à 1,25 µg/mL pendant une nuit à 37°C puis un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome à 2 µg/mL pendant 2 heures, ce qui permet de marquer la protéine de jonction serrée occludine. Enfin, des cellules ont été marquées avec du Ulex Europaeus Agglutinin I (UEA1) couplée au fluorochrome FITC à 10 µg/mL pendant 1 heure, qui est une lectine permettant de marquer les résidus fucoses des glycoprotéines.

Chaque monocouche cellulaire a été placée sur une lame de microscope et recouverte de milieu de montage supplémenté à 5 µg/mL en DAPI, un marqueur qui cible les doubles brins d'ADN afin de repérer les noyaux cellulaires. Les lames ont été conservées à l'obscurité à 4 °C jusqu'à leur observation au microscope confocal à la plateforme TRI (Toulouse Réseau Imagerie, GenoToul) à Toulouse.

## **J. Microscopie électronique à transmission**

Après 48 heures de traitement, les monocouches ont été fixées avec 400 µL au pôle apical et 500 µL au pôle basal de solution de glutaraldéhyde 2% préparé dans une solution tampon de

Sorensen 0.1 M puis conservées à 4°C. Les monocouches ont été préparées et observées la plateforme CMEAB (Centre de microscopie électronique appliqué à la biologie, GenoToul) à Toulouse.

## **K. Statistiques**

Les analyses statistiques ont toutes été réalisées avec le logiciel R (version 4.2.3) et en utilisant les packages multcomp, car, lme4 et emmeans. Un modèle linéaire mixte a été utilisé en prenant en compte comme effet fixe le traitement et, lorsque nécessaire, le temps et l'interaction de ces deux facteurs. Le modèle a également pris en compte les effets aléatoires liés au porc duquel proviennent les organoïdes, ainsi que le puits lorsqu'il y avait des mesures répétées sur le même puits. Des comparaisons 2 à 2 entre toutes les conditions ont été réalisées avec la fonction emmeans. Pour étudier les cinétiques, les comparaisons 2 à 2 des traitements ont été réalisées pour chaque temps. Les analyses en composantes principales ont été réalisées avec le package MixOmics.

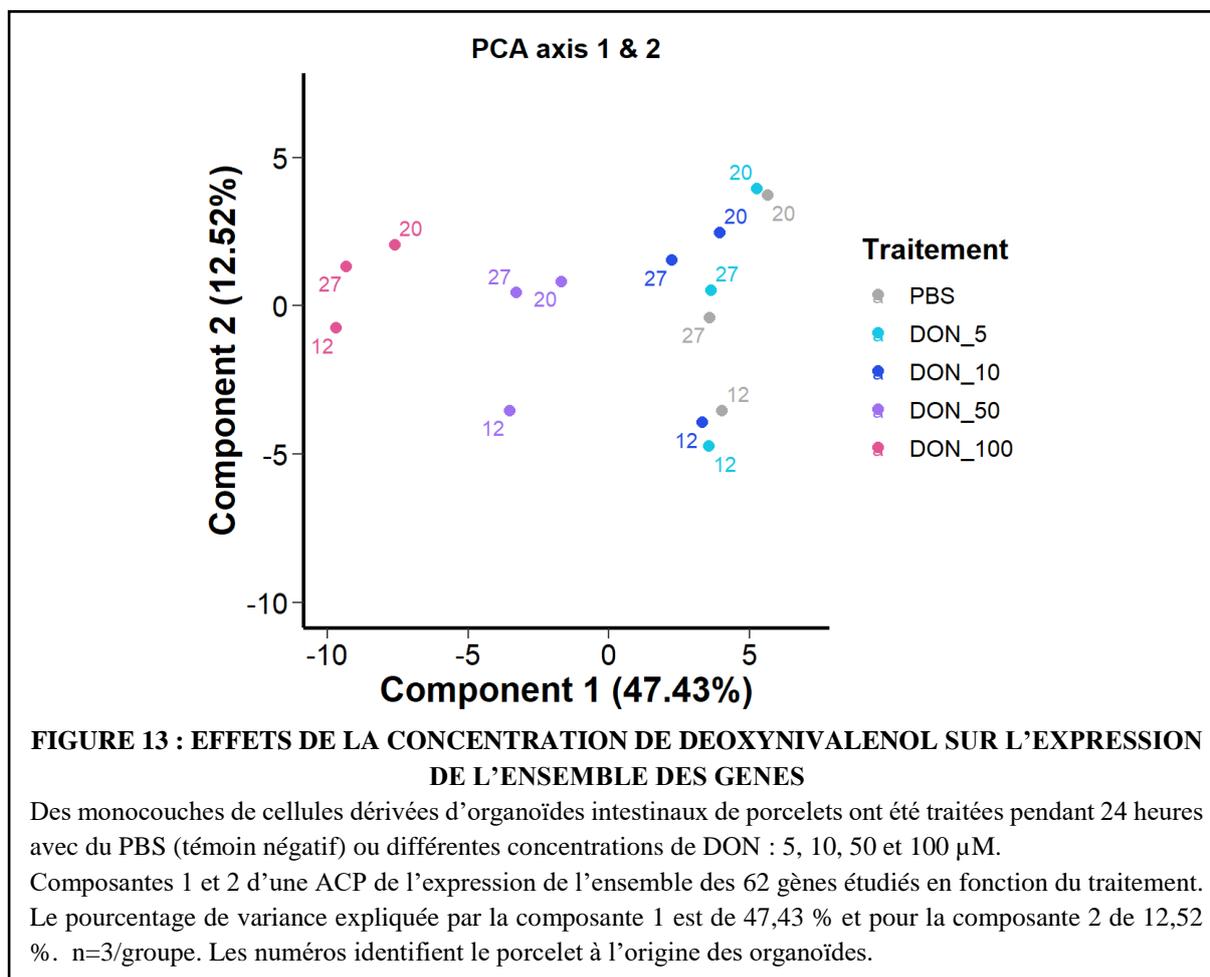
Tous nos résultats ont été exprimés relativement à la valeur mesurée dans le puits contrôle du même porcelet, c'est-à-dire le puits traité seulement au PBS pendant les 48 heures de traitement. Le contrôle a été représenté par la ligne pointillée à  $y = 1$ . Une différence significative entre un groupe et le groupe PBS avec une valeur de  $p < 0,05$  a été représentée par \*. Une différence significative entre deux groupes avec une valeur de  $p < 0,05$  a été représentée par des lettres différentes. Pour les mesures de la TEER qui sont dépendantes du temps, les conditions sont comparées entre elles pour chaque temps.

## II. Résultats

### A. Etude dose-réponse des effets du déoxynivalénol

L'objectif de cette partie était d'étudier les effets de différentes concentrations de DON sur notre modèle de monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets. Les concentrations étudiées étaient comprises entre 1  $\mu\text{M}$ , correspondant à des concentrations utilisées pour des explants intestinaux de porcs (Kolf-Clauw et al. 2009), et 100  $\mu\text{M}$ , car une plus grande résistance au DON était attendue en comparaison des lignées cellulaires pour les cellules différenciées présentes dans notre modèle de monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets (Luo et al. 2021). En supposant que le DON ingéré sur un repas par un porc est dilué dans 1 litre de fluide gastrointestinal (Pinton et al. 2009), ces concentrations en DON *in vitro* correspondraient à des concentrations entre 0,3 et 30 mg/kg de nourriture, ce qui correspond aux concentrations retrouvées dans les céréales contaminées par le DON (Holanda, Kim 2021), allant d'une intoxication chronique à aigüe.

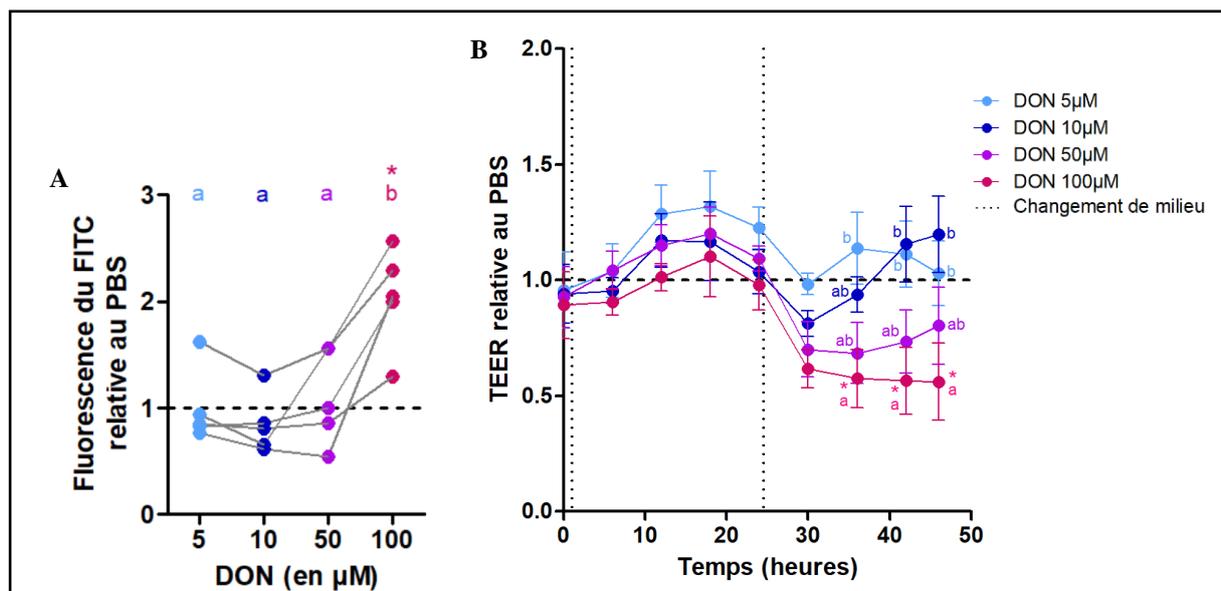
Une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée à partir de l'expression de l'ensemble des 62 gènes étudiés (Figure 13). La composante 1 met en évidence des différences entre trois groupes : les traitements PBS, 5  $\mu\text{M}$  de DON et 10  $\mu\text{M}$  de DON ; le traitement 50



$\mu\text{M}$  de DON ; le traitement  $100 \mu\text{M}$  de DON. L'analyse de l'expression des gènes a donc mis en évidence une influence des traitements de  $50$  et  $100 \mu\text{M}$  de DON par rapport à la condition contrôle (PBS) (Figure 13). Comme attendu, l'effet du DON semble plus fort à  $100$  que à  $50 \mu\text{M}$ .

### 1. Effets de la concentration du déoxynivalénol sur la perméabilité épithéliale

La perméabilité paracellulaire de la monocouche épithéliale au FITC-dextran  $4 \text{ kDa}$  était significativement plus élevée par rapport au contrôle seulement avec une concentration de DON de  $100 \mu\text{M}$  (Figure 14A). Il y avait une diminution significative de la TEER par rapport au contrôle seulement pour une concentration de DON de  $100 \mu\text{M}$  dès  $12 \text{ h}$  d'exposition au DON (Figure 14B). Le DON à  $50 \mu\text{M}$  a eu tendance à réduire la TEER, mais ces effets n'étaient pas significatifs (Figure 14B). L'expression des différents gènes codant pour des protéines de jonctions serrées ont été impactés pour différentes concentrations de DON. Pour des



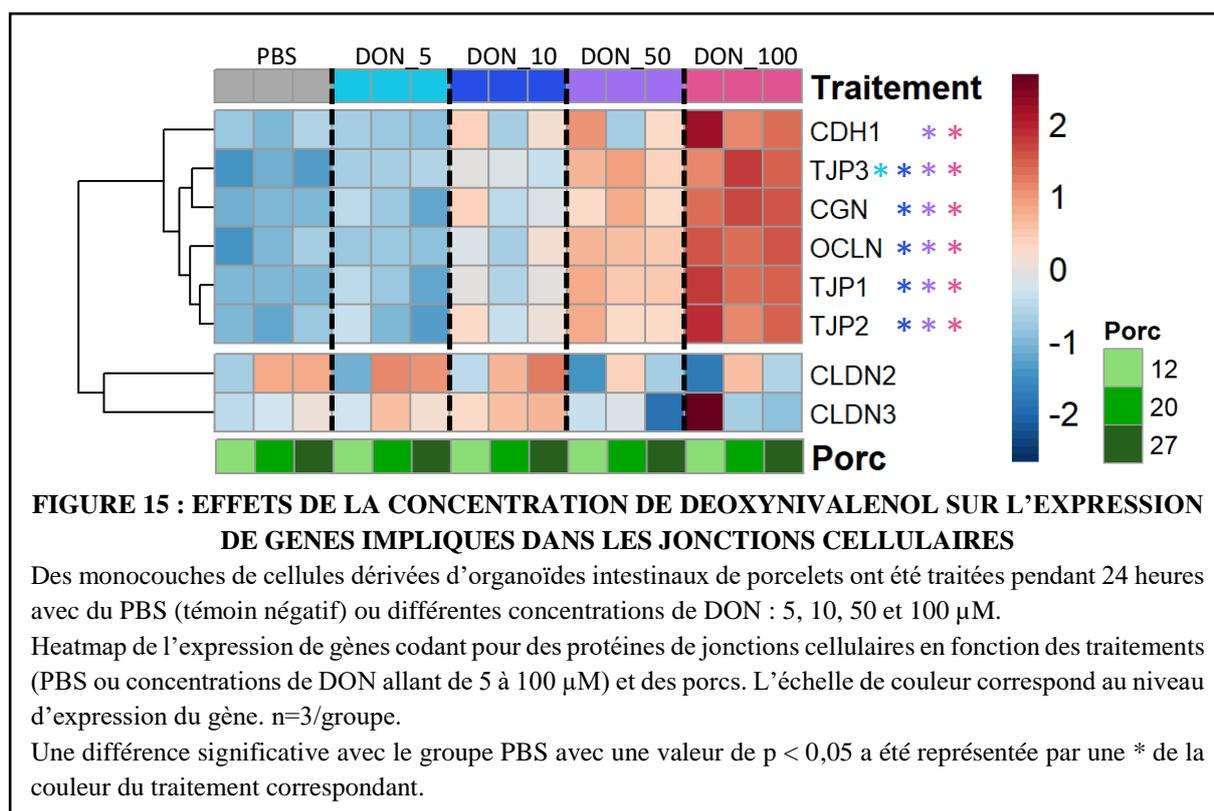
**FIGURE 14 : EFFETS DE LA CONCENTRATION DE DEOXYNIVALÉNOLE SUR LA PERMEABILITÉ ÉPITHÉLIALE**

Des monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets ont été traitées pendant 24 heures avec du PBS (témoin négatif) ou différentes concentrations de DON :  $5$ ,  $10$ ,  $50$  et  $100 \mu\text{M}$ .

**A** – Mesure de la perméabilité au FITC-dextran  $4 \text{ kDa}$  dans le milieu basal des monocouches de cellules dérivées d'organoïdes après  $2 \text{ h}$  d'incubation à  $37^\circ\text{C}$  en fonction de la concentration en DON allant de  $5$  à  $100 \mu\text{M}$ .  $n=5/\text{groupe}$ . Chaque ligne relie les échantillons d'un même porc pour les différentes conditions. **B** – Mesure en continue de la TEER de  $0$  à  $48$  heures de traitement en fonction de la concentration en DON (ajouté à  $24 \text{ h}$  de traitement) allant de  $5$  à  $100 \mu\text{M}$ . Représentatif de  $n=5/\text{groupe}$ .

Les résultats ont été exprimés relativement à la valeur mesurée dans le puits contrôle du même porcelet (traité seulement au PBS pendant  $48$  heures), qui est représenté par la ligne pointillée à  $y = 1$ . Une différence significative avec le groupe PBS avec une valeur de  $p < 0,05$  a été représentée par \*. Une différence significative entre deux groupes avec une valeur de  $p < 0,05$  a été représentée par des lettres différentes. Pour les mesures de la TEER qui sont dépendantes du temps, les conditions sont comparées entre elles pour chaque temps.

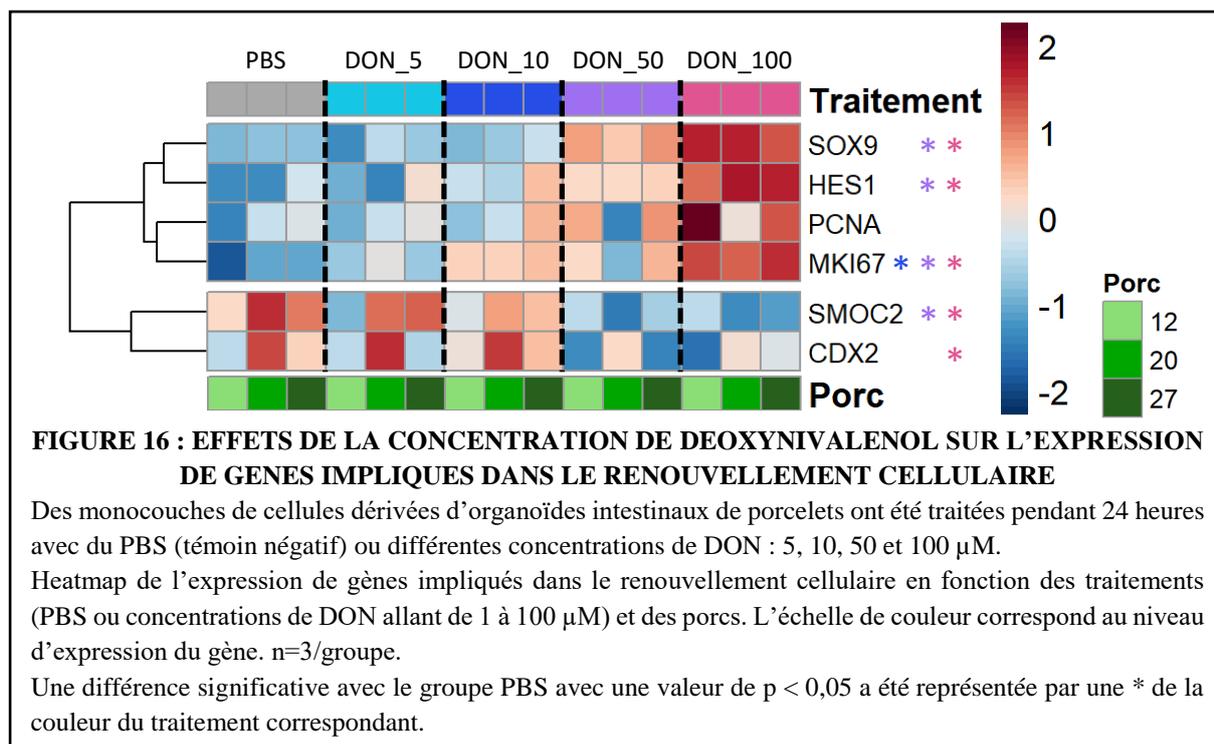
concentrations de 10, 50 et 100  $\mu\text{M}$  de DON, les gènes CGN, OCLN, TJP1 et TJP2 sont surexprimés par rapport au PBS (Figure 15). Des concentrations de 5, 10, 50 et 100  $\mu\text{M}$  de DON ont induit une surexpression du gène TJP3 par rapport au PBS (Figure 15). Des concentrations de 50 et 100  $\mu\text{M}$  de DON ont induit une surexpression du gène CDH1, codant pour une protéine de jonction adhérente, par rapport au PBS (Figure 15). La modification de l'expression de ces gènes et de la perméabilité épithéliale suggère que le DON module les mécanismes de formation des jonctions cellulaires.



## 2. Effets de la concentration du déoxynivalénole sur le renouvellement cellulaire

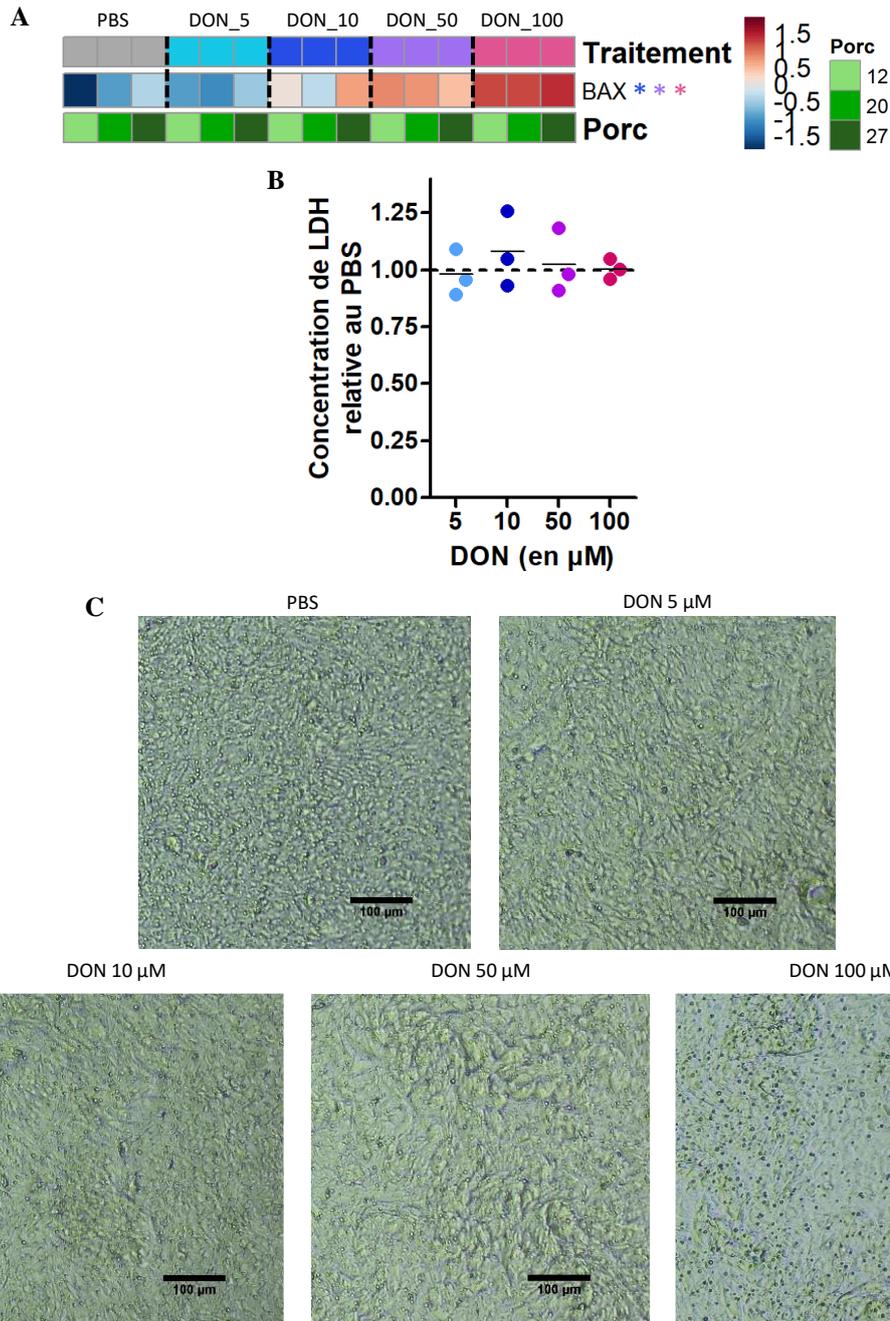
Le gène MKI67, marqueur de la prolifération, était surexprimé pour des concentrations en DON de 10, 50 et 100  $\mu\text{M}$  par rapport au PBS (Figure 16). Les gènes HES1 et SOX9, également marqueurs de la prolifération, étaient surexprimés pour des concentrations en DON de 50 et 100  $\mu\text{M}$  par rapport au PBS (Figure 16). A l'inverse, les gènes SMOC2 et CDX2, marqueurs de la prolifération et des cellules souches, étaient sous-exprimés respectivement pour des concentrations en DON de 50 et 100  $\mu\text{M}$  ou de 100  $\mu\text{M}$  par rapport au PBS (Figure 16). Le gène BAX, impliqué dans les mécanismes d'apoptose, était surexprimé pour des concentrations en DON de 10, 50 et 100  $\mu\text{M}$  par rapport au PBS (Figure 17A). Cependant la concentration de LDH dans le milieu de culture apical n'était pas modifiée par les différentes concentrations de

DON par rapport au contrôle donc le DON n'a pas induit de toxicité sur les monocouches de cellules d'organoïdes à ces concentrations (Figure 17B). Ce résultat est confirmé par l'observation des monocouches à l'issue des 48 heures de traitement, où l'intégrité du tapis cellulaire était toujours maintenue quelle que soit la concentration en DON utilisée, bien que la morphologie des cellules semble modifiée (cellules plus étirées avec les concentrations élevées de DON) (Figure 17C). Globalement, ces résultats suggèrent une augmentation de la prolifération induite par le DON.



### 3. Effets de la concentration du déoxynivalénol sur la différenciation cellulaire

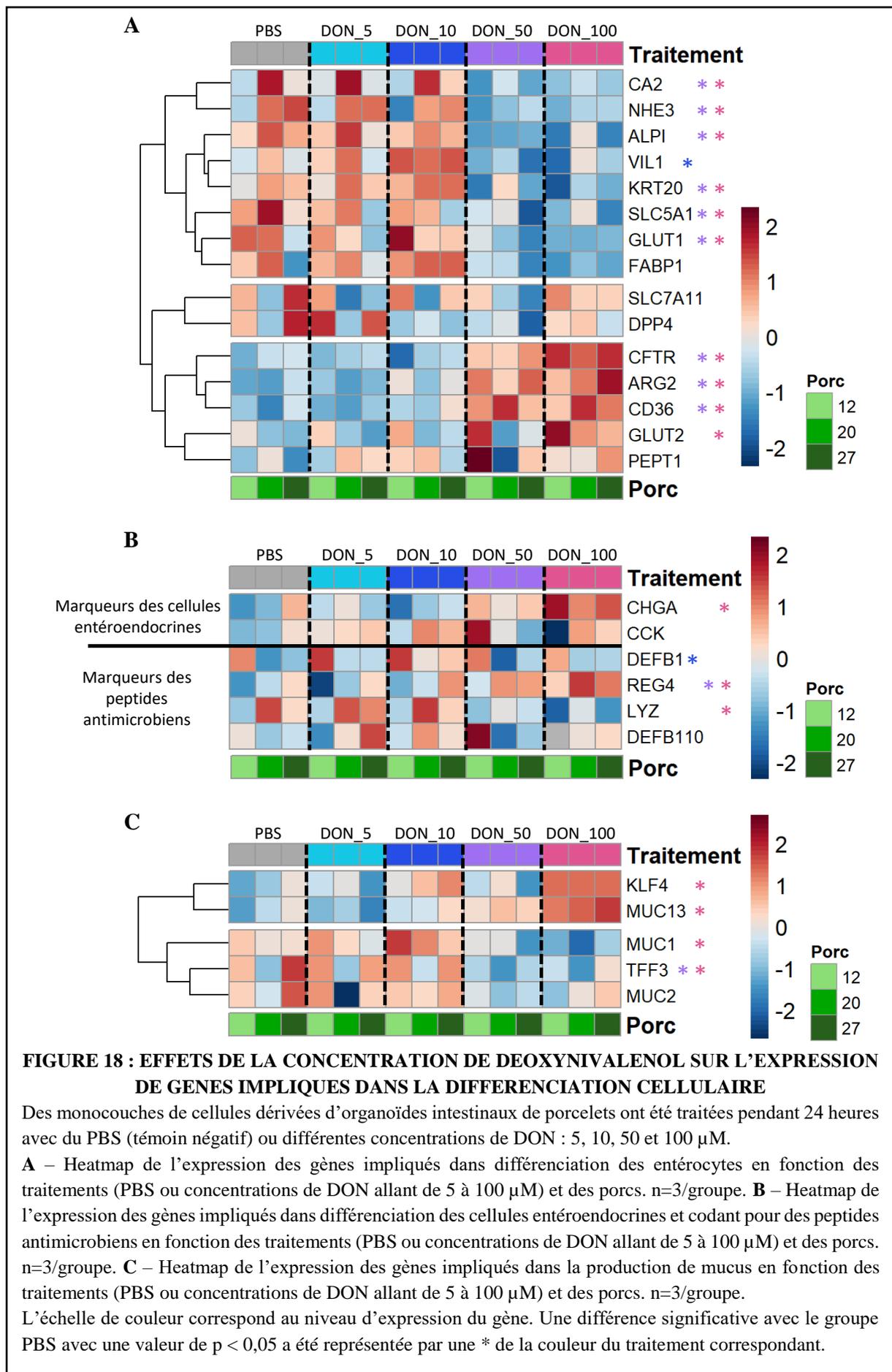
L'expression des gènes marqueurs de la différenciation des entérocytes était impactée pour différentes concentrations de DON. Les gènes CA2, NHE3, ALPI, KRT20, SLC5A1 et GLUT1 étaient sous-exprimés pour des concentrations en DON de 50 et 100  $\mu\text{M}$  par rapport au PBS, et le gène VIL1 était surexprimé seulement pour 10  $\mu\text{M}$  de DON par rapport au PBS (Figure 18A). Les gènes CFTR, ARG2 et CD36 étaient surexprimés pour des concentrations en DON de 50 et 100  $\mu\text{M}$  par rapport au PBS, et le gène GLUT2 était surexprimé seulement pour 100  $\mu\text{M}$  de DON par rapport au PBS (Figure 18A). L'expression du gène CHGA, marqueur de la différenciation des cellules entéroendocrines, était surexprimé pour une concentration en DON de 100  $\mu\text{M}$  par rapport au PBS (Figure 18B). Parmi les gènes codant pour des peptides antimicrobiens, le gène DEFB1 était surexprimé pour une concentration en DON de 10  $\mu\text{M}$  par rapport au PBS, le gène REG4



**FIGURE 17 : EFFETS DE LA CONCENTRATION DE DEOXYNIVALENOL SUR LES DOMMAGES CELLULAIRES**

Des monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets ont été traitées pendant 24 heures avec du PBS (témoin négatif) ou différentes concentrations de DON : 5, 10, 50 et 100  $\mu\text{M}$ .

**A** – Heatmap de l'expression d'un gène impliqué dans l'apoptose en fonction des traitements (PBS ou concentrations de DON allant de 5 à 100  $\mu\text{M}$ ) et des porcs. Une différence significative avec le groupe PBS avec une valeur de  $p < 0,05$  a été représentée par une \* de la couleur du traitement correspondant. L'échelle de couleur correspond au niveau d'expression du gène.  $n=3/\text{groupe}$ . **B** – Mesure de l'absorbance de la LDH dans le milieu apical des monocouches de cellules dérivées d'organoïdes en fonction de la concentration en DON allant de 5 à 100  $\mu\text{M}$ .  $n=3/\text{groupe}$ . Les résultats ont été exprimés relativement à la valeur mesurée dans le puits contrôle du même porcelet (traité seulement au PBS pendant 48 heures), qui est représentée par la ligne pointillée à  $y = 1$ . Une différence significative avec le groupe PBS avec une valeur de  $p < 0,05$  a été représentée par \*. Une différence significative entre deux groupes avec une valeur de  $p < 0,05$  a été représentée par des lettres différentes. **C** – Photos des tapis cellulaires après 48 heures de traitement pour un porc, observé au microscope optique au grossissement  $\times 10$ . Barre d'échelle de 100  $\mu\text{M}$ . Représentatif de  $n=3/\text{groupe}$ .



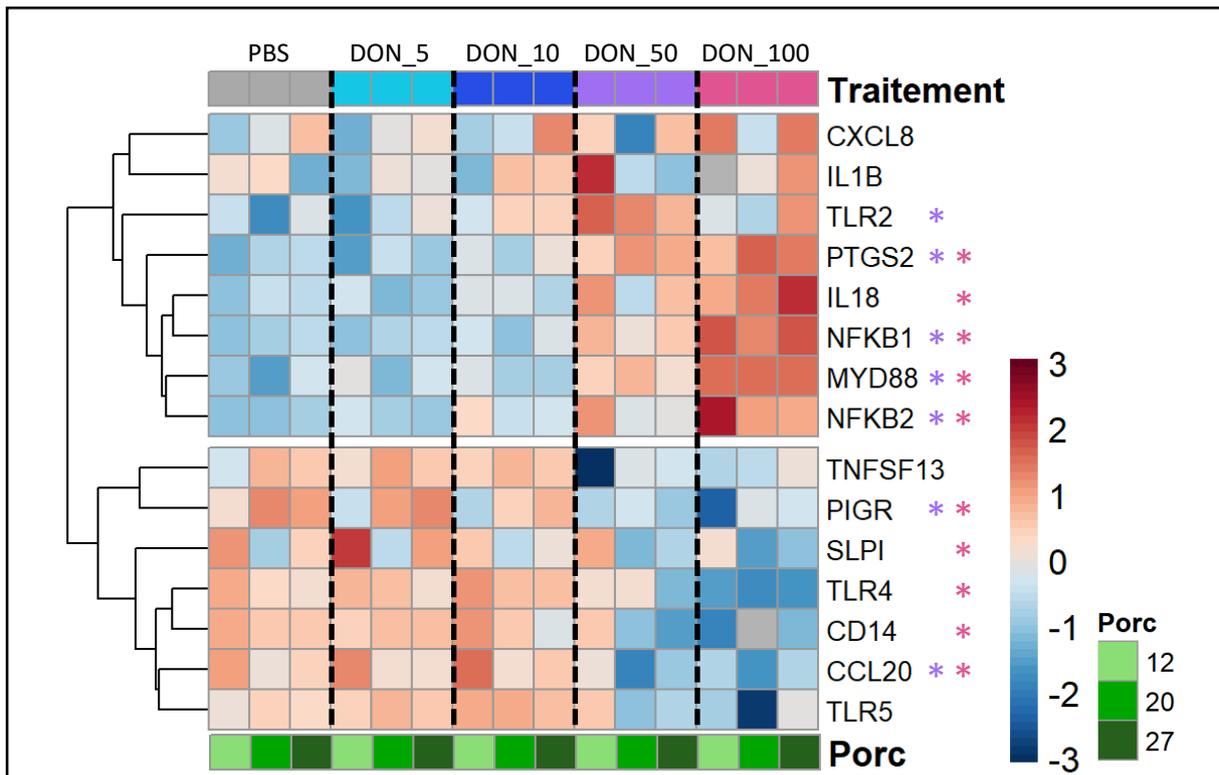
était surexprimé pour 50 et 100  $\mu\text{M}$  par rapport au PBS, et le gène LYZ est sous-exprimé pour 100  $\mu\text{M}$  par rapport au PBS (Figure 18B). L'activité du lysozyme a été quantifiée dans le milieu apical des monocouches dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets mais aucune activité de cette enzyme n'a été détectée (données non présentées). Parmi les gènes impliqués dans la production de mucus, les gènes KLF4 et MUC13 étaient surexprimés pour une concentration en DON de 100  $\mu\text{M}$  par rapport au PBS, et l'expression des gènes MUC1 et TFF3 étaient réduites respectivement pour 100  $\mu\text{M}$  et 50 et 100  $\mu\text{M}$  de DON par rapport au PBS (Figure 18C). La modification de l'expression de ces gènes suggère que le DON module les mécanismes de différenciation des cellules épithéliales intestinales.

#### **4. Effets de la concentration du déoxynivalénol sur les mécanismes de défense**

L'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire des cellules épithéliales intestinales était impactée pour différentes concentrations de DON. Les gènes PTGS2, MYD88, NF $\kappa$ B1 et NF $\kappa$ B2 étaient surexprimés pour des concentrations en DON de 50 et 100  $\mu\text{M}$  par rapport au PBS (Figure 19). Les gènes TLR2 et IL18 étaient surexprimés respectivement pour 50 et 100  $\mu\text{M}$  de DON par rapport au PBS (Figure 19). Les gènes PIGR et CCL20 étaient sous-exprimés pour des concentrations en DON de 50 et 100  $\mu\text{M}$  par rapport au PBS (Figure 19). Les gènes SLPI, TLR4 et CD14 étaient surexprimés pour 100  $\mu\text{M}$  de DON par rapport au PBS (Figure 19). La modification de l'expression de ces gènes suggère que le DON module les mécanismes de régulation de la réponse immunitaire innée dans les cellules épithéliales.

Les gènes GPX1 et SOD2, impliqués dans des mécanismes de protection contre les ROS, étaient surexprimés avec des concentrations de DON de 50 et 100  $\mu\text{M}$  par rapport au PBS (Figure 20). A l'inverse, le gène GPX2, impliqué également dans des mécanismes de protection contre les ROS, était sous-exprimé par des concentrations en DON de 50 et 100  $\mu\text{M}$  par rapport au PBS (Figure 20). Le DON perturbe donc l'équilibre de l'expression des gènes impliqués dans l'équilibre redox à des concentrations de 50 et 100  $\mu\text{M}$ .

Au vu de l'ensemble de ces résultats, une concentration en DON de 50  $\mu\text{M}$  modifie l'expression de certains gènes des monocouches dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets. Cependant nous retiendrons pour la suite la concentration de 100  $\mu\text{M}$  qui modifie d'avantage l'expression des gènes mais augmente également la perméabilité épithéliale, comme indiqué par la mesure de la TEER et de la perméabilité au FITC-dextran 4 kDa.

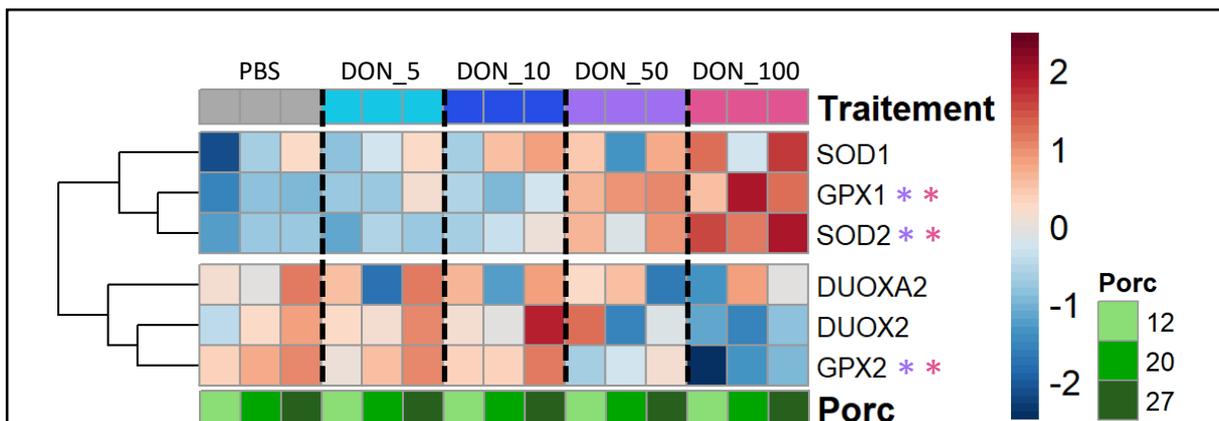


**FIGURE 19 : EFFETS DE LA CONCENTRATION DE DEOXYNIVALENOL SUR L'EXPRESSION DE GENES IMPLIQUES DANS LA REponse IMMUNITAIRE**

Des monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets ont été traitées pendant 24 heures avec du PBS (témoin négatif) ou différentes concentrations de DON : 5, 10, 50 et 100  $\mu\text{M}$ .

Heatmap de l'expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire en fonction des traitements (PBS ou concentrations de DON allant de 1 à 100  $\mu\text{M}$ ) et des porcs. n=3/groupe.

L'échelle de couleur correspond au niveau d'expression du gène. Une différence significative avec le groupe PBS avec une valeur de  $p < 0,05$  a été représentée par une \* de la couleur du traitement correspondant.



**FIGURE 20 : EFFETS DE LA CONCENTRATION DE DEOXYNIVALENOL SUR L'EXPRESSION DE GENES IMPLIQUES DANS L'EQUILIBRE REDOX**

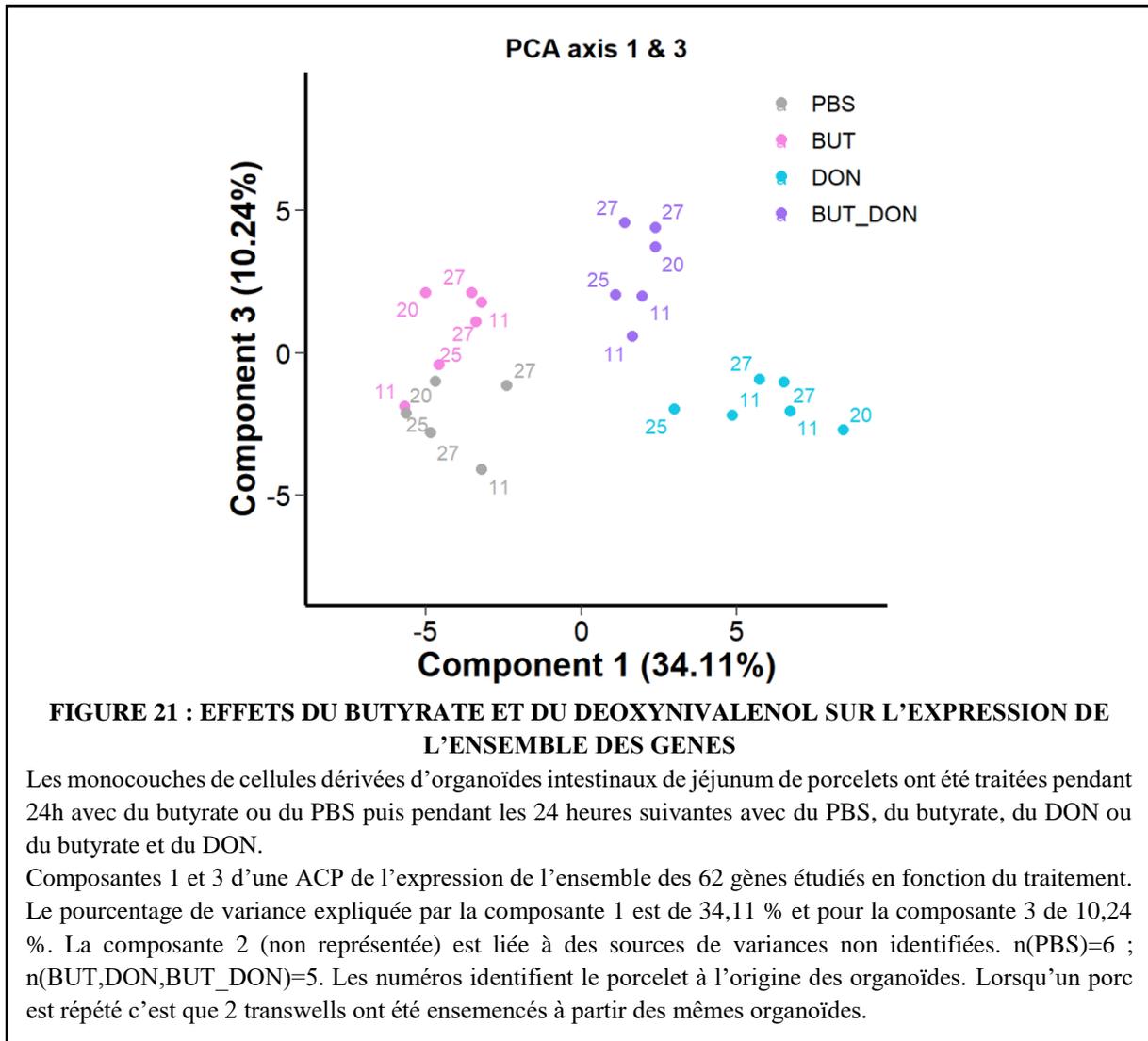
Des monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets ont été traitées pendant 24 heures avec du PBS (témoin négatif) ou différentes concentrations de DON : 5, 10, 50 et 100  $\mu\text{M}$ .

Heatmap de l'expression des gènes impliqués dans l'équilibre redox en fonction des traitements (PBS ou concentrations de DON allant de 5 à 100  $\mu\text{M}$ ) et des porcs. n=3/groupe.

L'échelle de couleur correspond au niveau d'expression du gène. Une différence significative avec le groupe PBS avec une valeur de  $p < 0,05$  a été représentée par une \* de la couleur du traitement correspondant.

## B. Etude des effets du butyrate et du déoxynivalénol

L'objectif de cette partie était d'étudier si le butyrate permet de prévenir certains des effets délétères du DON. Comme déterminé par la partie précédente de notre étude, nous avons utilisé une concentration en DON de 100  $\mu$ M. Nous avons choisi d'utiliser une concentration en butyrate de 1 mM car il a déjà été utilisé sur des entéroïdes humains, murins et porcins à cette concentration (Pearce et al. 2020; Beaumont et al. 2023).

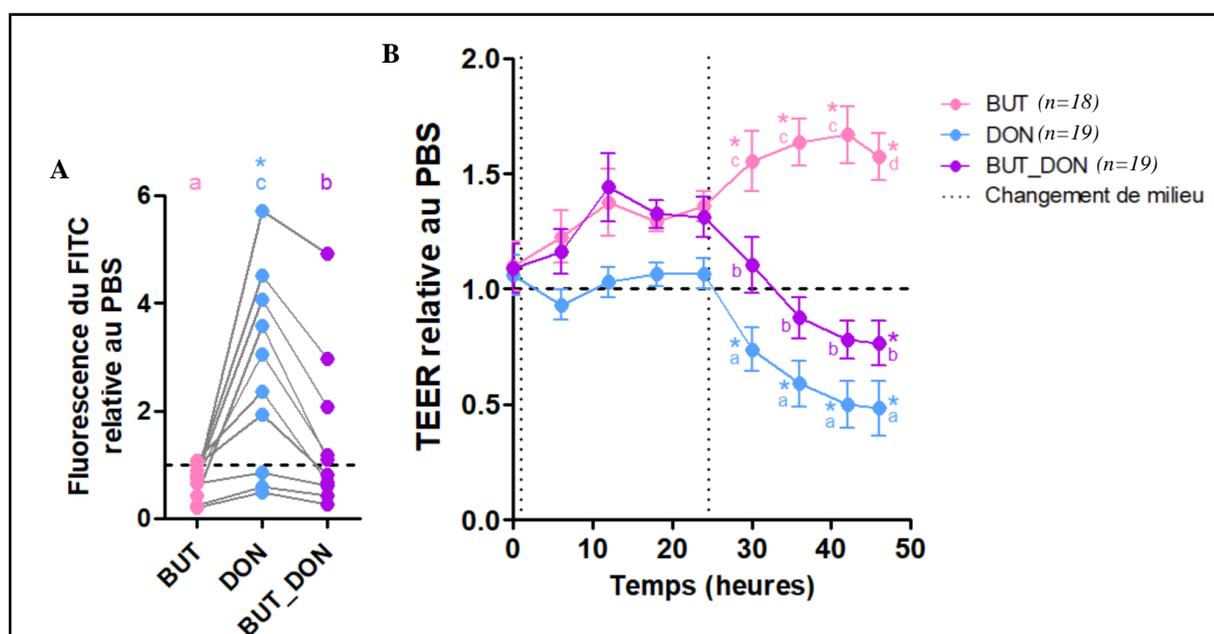


Une ACP a été réalisée à partir de l'expression de l'ensemble des 62 gènes étudiés (Figure 21). La composante 1 a mis en évidence l'effet du DON sur les profils d'expression de gènes. La composante 3 a mis en évidence l'effet du butyrate sur les profils d'expression de gènes. La composante 2 était liée à des sources de variabilités non identifiées. On voit également que les monocouches traitées au butyrate et au DON ont formé un groupe distinct où les effets du DON semblaient atténués par rapport au DON seul. Par la suite, nous ne présenterons que les gènes

pour lesquels l'effet du DON est significatif par rapport au PBS dans le but de répondre à l'objectif qui était de tester si le butyrate pouvait moduler les effets du DON.

### 1. Effets du butyrate et du déoxynivalénol sur la perméabilité épithéliale

Le butyrate a permis de réduire significativement l'augmentation de la perméabilité au FITC-dextran 4 kDa induite par le DON (Figure 22A), et d'atténuer la diminution de la TEER induite par le DON dès 6 heures d'exposition (Figure 22B). Parmi les gènes codant pour les protéines de jonctions serrées, le butyrate a seulement permis de réduire l'augmentation de l'expression des gènes OCLN et TJP1 induite par le DON (Figure 23A). L'occludine a été observée au microscope confocal mais aucune variation répétable entre les traitements n'a pu être mise en évidence sur les 3 répétitions de ce marquage (Figure 23B).



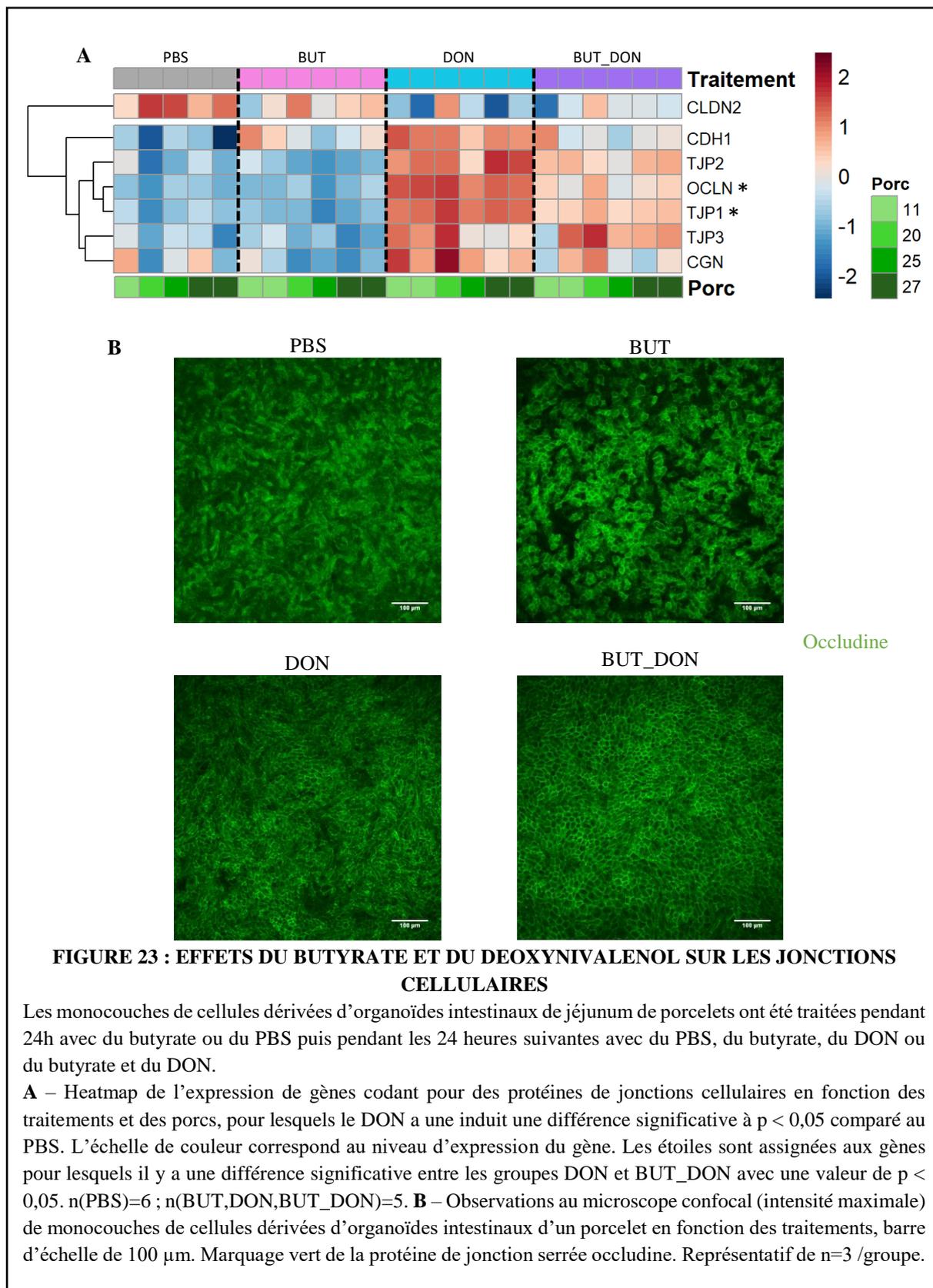
**FIGURE 22 : EFFETS DU BUTYRATE ET DU DEOXYNIVALÉNOL SUR LA PERMEABILITE EPITHELIALE**

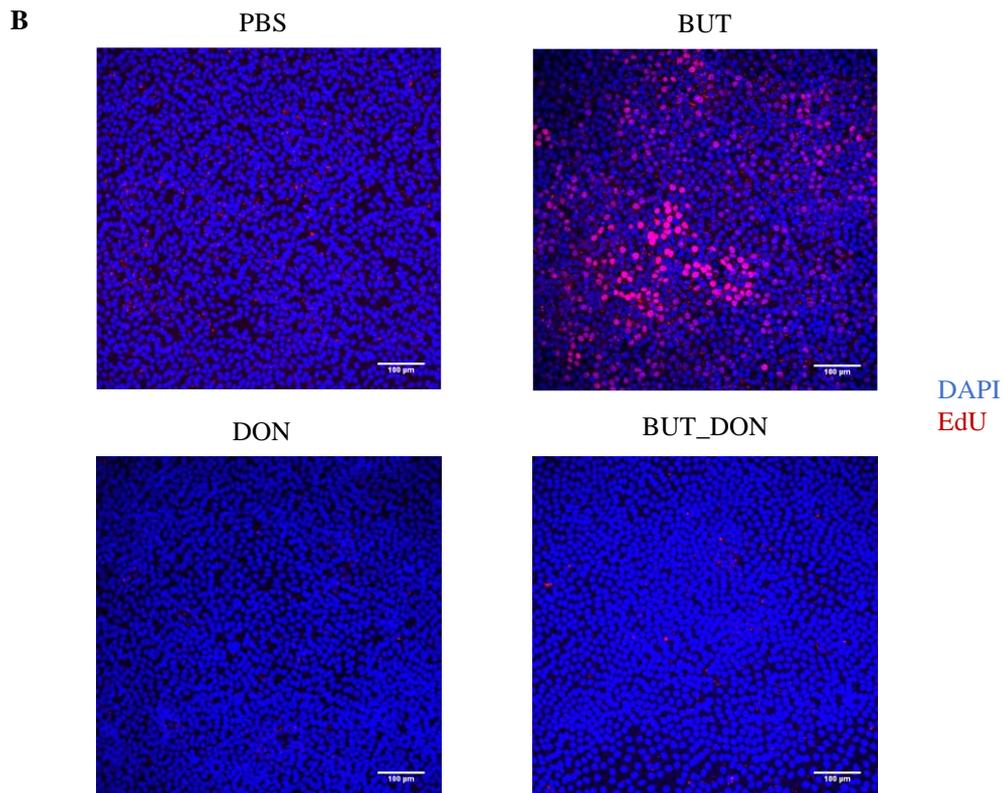
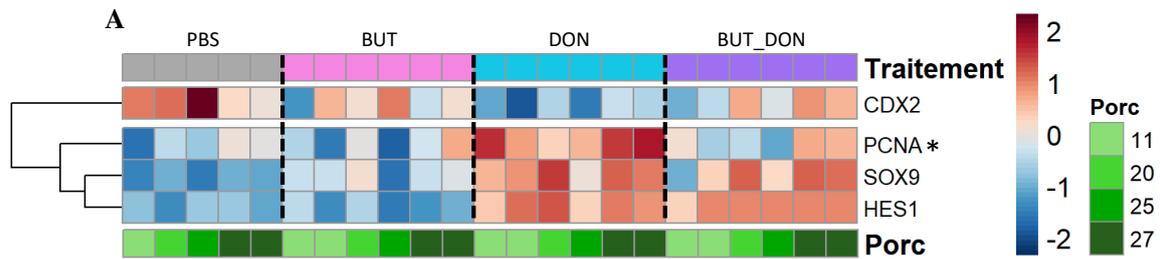
Les monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de jéjunum de porcelets ont été traitées pendant 24h avec du butyrate ou du PBS puis pendant les 24 heures suivantes avec du PBS, du butyrate, du DON ou du butyrate et du DON.

**A** – Mesure de la perméabilité au FITC-dextran 4 kDa dans le milieu basal des monocouches de cellules dérivées d'organoïdes après 2h d'incubation à 37°C en fonction du traitement. n=10/groupe. Chaque ligne relie les échantillons d'un même porc pour les différentes conditions. **B** – Mesure en continu de la TEER de 0 à 48h heures de traitement en fonction du traitement.

Les résultats ont été exprimés relativement à la valeur mesurée dans le puits contrôle du même porcelet (traité seulement au PBS pendant 48 heures), qui est représenté par la ligne pointillée à y = 1. Une différence significative avec le groupe PBS avec une valeur de  $p < 0,05$  a été représentée par \*. Une différence significative entre deux groupes avec une valeur de  $p < 0,05$  a été représentée par des lettres différentes. Pour les mesures de la TEER qui sont dépendantes du temps, les conditions sont comparées entre elles pour chaque temps.

\*





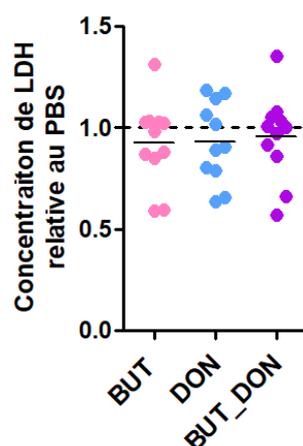
**FIGURE 24 : EFFETS DU BUTYRATE ET DU DEOXYNIVALENOL SUR LE RENOUELEMENT CELLULAIRE**

Les monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de jéjunum de porcelets ont été traitées pendant 24h avec du butyrate ou du PBS puis pendant les 24 heures suivantes avec du PBS, du butyrate, du DON ou du butyrate et du DON.

**A** – Heatmap de l'expression de gènes impliqués dans le renouvellement en fonction des traitements et des porcs, pour lesquels le DON a induit une différence significative à  $p < 0,05$  comparé au PBS. L'échelle de couleur correspond au niveau d'expression du gène. Les étoiles sont assignées aux gènes pour lesquels il y a une différence significative entre les groupes DON et BUT\_DON avec une valeur de  $p < 0,05$ .  $n(\text{PBS})=6$  ;  $n(\text{BUT,DON,BUT\_DON})=5$ . **B** – Observations au microscope confocal (intensité maximale) de monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets d'un porcelet en fonction des traitements, barre d'échelle de 100 µm. Marquage bleu des noyaux au DAPI et marquage rouge de l'ADN néosynthétisé à l'EdU (cellules en prolifération). Représentatif de  $n=3/\text{groupe}$ .

## 2. Effets du butyrate et du déoxynivalénol sur le renouvellement cellulaire

Le gène PCNA, marqueur de la prolifération, était le seul gène impliqué dans le renouvellement cellulaire pour lequel le butyrate a permis de réduire l'effet du DON (Figure 24A). Le marquage des cellules en prolifération avec l'EdU a mis en évidence les noyaux qui ont subi un cycle mitotique dans les deux dernières heures avant la fixation. Le butyrate a fortement augmenté la prolifération mais cet effet n'a pas été observé en présence de DON (Figure 24B). De plus, la concentration de LDH dans le milieu de culture apical n'était pas modifiée par les différents traitements par rapport au contrôle (Figure 25).



**FIGURE 25 : EFFETS DU BUTYRATE ET DU DEOXYNIVALENOL SUR LES DOMMAGES CELLULAIRES**

Les monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de jéjunum de porcelets ont été traitées pendant 24h avec du butyrate ou du PBS puis pendant les 24 heures suivantes avec du PBS, du butyrate, du DON ou du butyrate et du DON.

Mesure de l'absorbance de la LDH dans le milieu apical des monocouches de cellules dérivées d'organoïdes en fonction des traitements. n=11/groupe.

Les résultats ont été exprimés relativement à la valeur mesurée dans le puits contrôle du même porcelet (traité seulement au PBS pendant 48 heures), qui est représenté par la ligne pointillée à  $y = 1$ . Une différence significative entre un groupe et le groupe PBS avec une valeur de  $p < 0,05$  a été représentée par \*. Une différence significative entre deux groupes avec une valeur de  $p < 0,05$  a été représentée par des lettres différentes.

## 3. Effets du butyrate et du déoxynivalénol sur la différenciation cellulaire

L'observation des monocouches dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets au microscope confocal (Figure 26A) a montré que le butyrate n'a pas permis d'atténuer la diminution de l'épaisseur du tapis cellulaire induite par le DON, reflétant une moindre différenciation (Figure 26C). L'observation des monocouches au microscope électronique (Figure 26B) a permis de réitérer les mesures d'épaisseur du tapis cellulaire et les résultats sont cohérents avec ceux décrits précédemment (Figure 26D). La microscopie électronique a également permis de

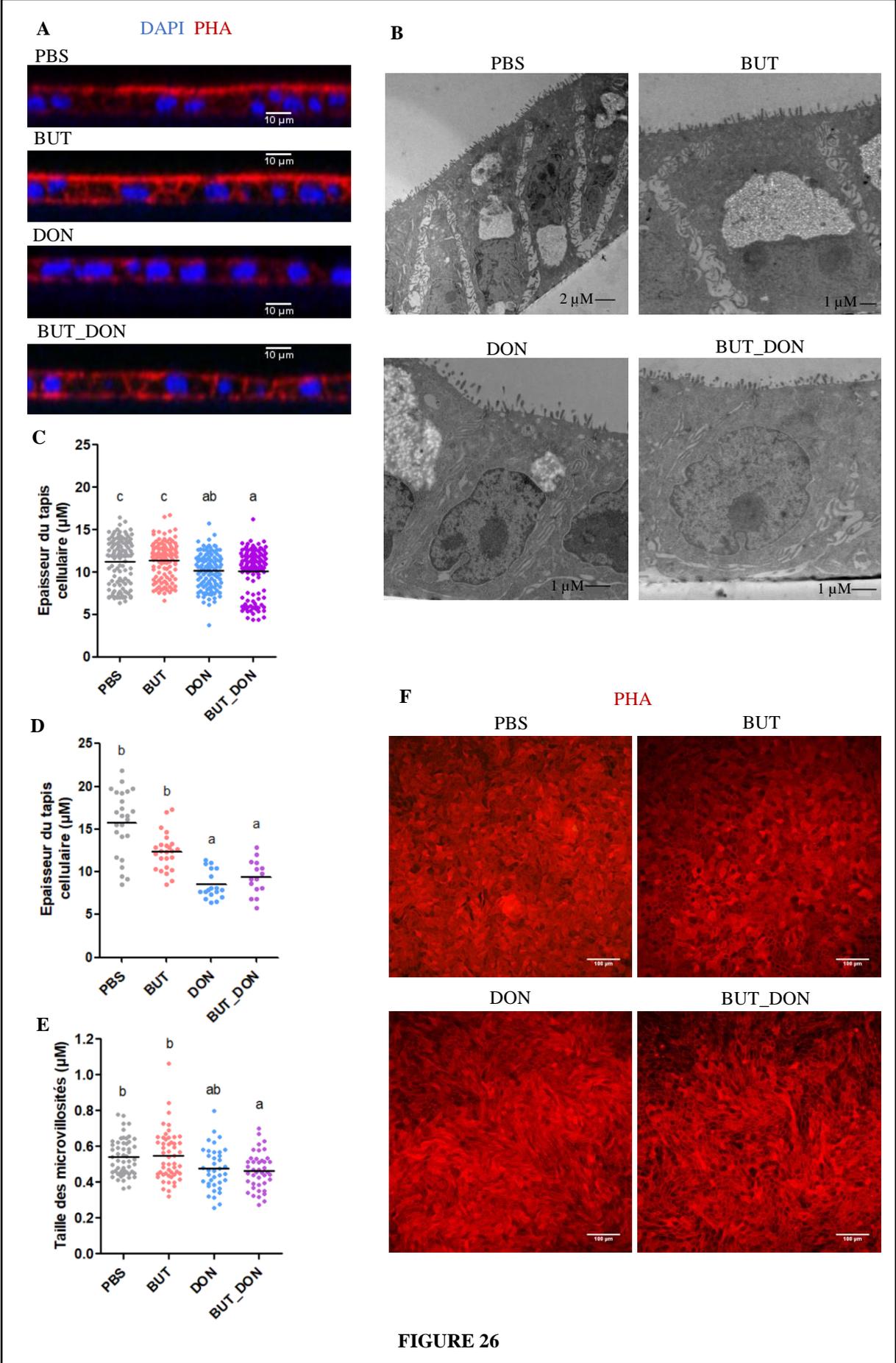
mesurer la taille des microvillosités présentes sur les cellules des monocouches dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets : le butyrate n'a pas atténué la diminution de la taille des villosités induite par le DON (Figure 26E). Le marquage de l'actine sur les monocouches a montré que le butyrate semble améliorer l'aspect géométrique des contours cellulaires qui étaient déformés par le DON (Figure 26F).

Le butyrate a permis de réduire l'augmentation de l'expression du gène CFTR induite par le DON, ainsi que d'atténuer la diminution de l'expression des gènes NHE3, CA2 et VIL1 induite par le DON, tous ces gènes étant des marqueurs de la différenciation des entérocytes (Figure 27A). Le butyrate a permis de réduire l'augmentation de l'expression du gène KLF4 induite par le DON, ainsi que d'atténuer la diminution de l'expression du gène MUC1, qui sont des gènes impliqués dans la production de mucus (Figure 27B). Le marquage des glycoprotéines, principalement des mucines, par la lectine UEA1 a mis en évidence la production de mucus (Annexe 1). Le marquage était très hétérogène en fonction des porcs donc ces données n'ont pas permis de conclure quant à un effet du butyrate et du DON sur la production de mucus dans notre modèle de monocouches dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets. Enfin, le butyrate n'a pas permis d'atténuer les effets du DON sur l'expression du gène DEFB1, impliqué dans la production de peptides antimicrobiens (Figure 27B).

#### **4. Effets du butyrate et du déoxynivalénol sur les mécanismes de défense**

Le butyrate a permis d'atténuer la diminution de l'expression des gènes TLR5 et CD14 induite par le DON, ainsi que de réduire l'augmentation de l'expression des gènes PTGS2, MYD88 et NFκB2 induite par le DON, tous ces gènes étant impliqués dans la réponse immunitaire innée épithéliale (Figure 28). De plus, CXCL8 a été quantifiée dans le milieu apical et basal des monocouches dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets mais n'a pas été détectée, quel que soit le traitement subit par les monocouches (données non présentées). Le butyrate n'a pas permis de réduire les effets du DON sur l'expression des gènes impliqués dans l'équilibre redox (Figure 29).

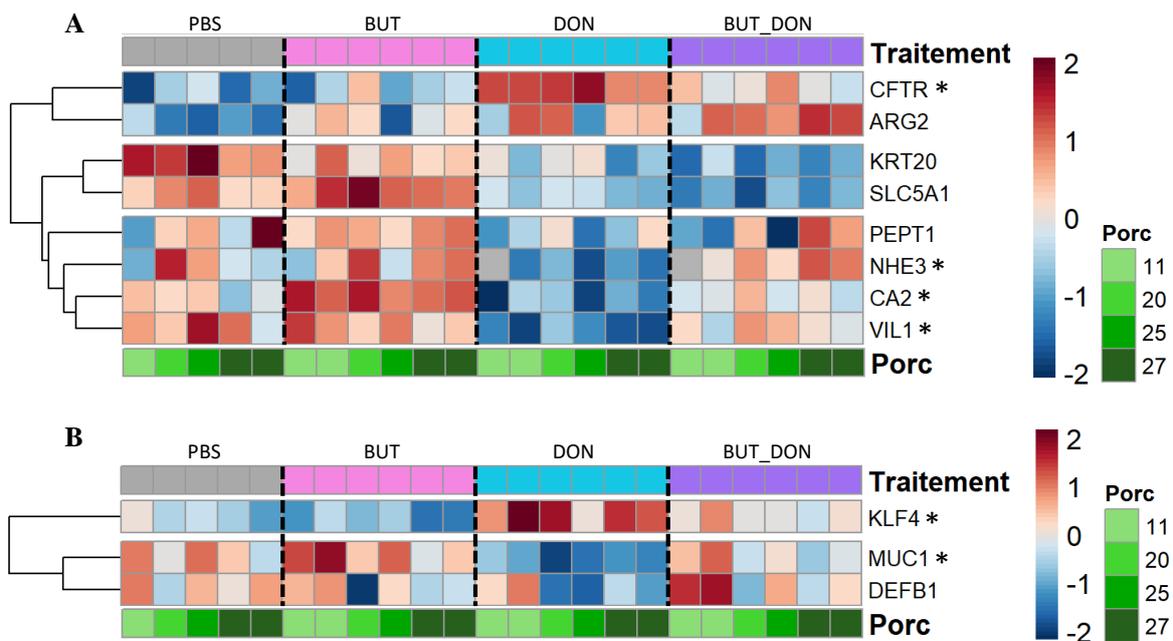
Au vu de l'ensemble de ces résultats, nous pouvons en déduire qu'une partie des fonctions altérées par le DON sont rétablies par l'effet du traitement préventif de butyrate.



## FIGURE 26 : EFFETS DU BUTYRATE ET DU DEOXYNIVALENOL SUR LA MORPHOLOGIE DES CELLULES

Les monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de jéjunum de porcelets ont été traitées pendant 24h avec du butyrate ou du PBS puis pendant les 24 heures suivantes avec du PBS, du butyrate, du DON ou du butyrate et du DON.

**A** – Reconstruction de coupes de monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux d'un porcelet en imagerie confocale en fonction des traitements. Coloration en bleu des noyaux avec du DAPI, coloration en rouge de l'actine avec de la PHA. Représentatif de n=3/groupe. **B** – Observation de coupes de monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux d'un porcelet en microscopie électronique en fonction des traitements. Représentatif de n=3/groupe. **C** – Mesure de l'épaisseur du tapis cellulaire des monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets sur les images obtenues au microscope confocal. n=3/groupe. **D** – Mesure de l'épaisseur du tapis cellulaire des monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets sur les images obtenues au microscope électronique. n=3/groupe. **E** – Mesure de la taille des microvillosités des monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets sur les images obtenues au microscope électronique. n=3/groupe. **F** – Observations au microscope confocal (intensité maximale) de monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux d'un porcelet en fonction des traitements, barre d'échelle de 100  $\mu$ m. Marquage rouge de l'actine par la PHA. Représentatif de n=3/groupe. Une différence significative entre deux groupes avec une valeur de  $p < 0,05$  a été représentée par des lettres différentes.

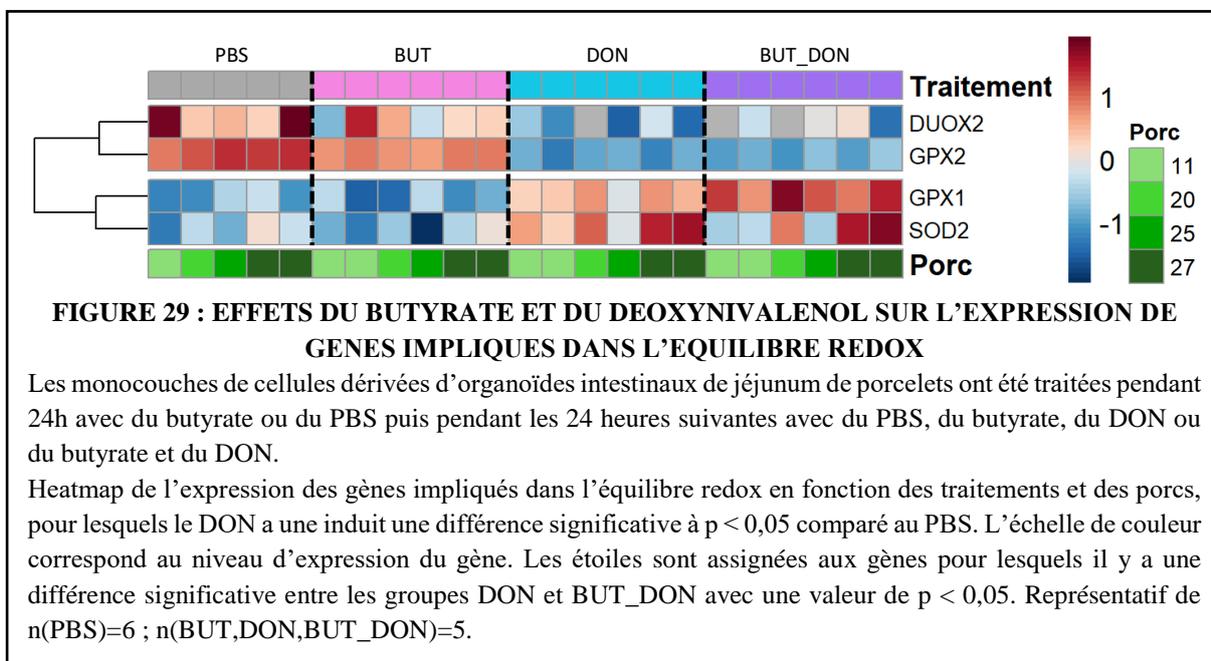
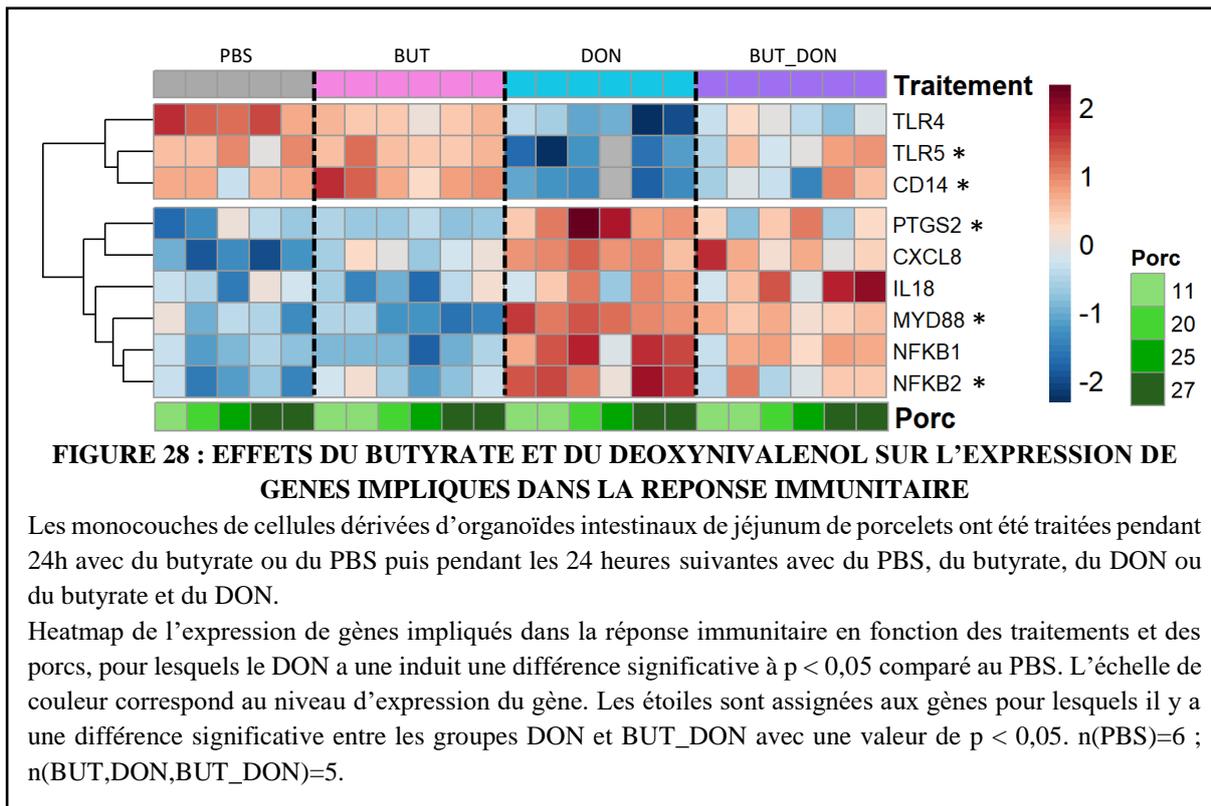


## FIGURE 27 : EFFETS DU BUTYRATE ET DU DEOXYNIVALENOL SUR L'EXPRESSION DE GENES IMPLIQUES DANS LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE

Les monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de jéjunum de porcelets ont été traitées pendant 24h avec du butyrate ou du PBS puis pendant les 24 heures suivantes avec du PBS, du butyrate, du DON ou du butyrate et du DON.

**A** – Heatmap de l'expression de gènes impliqués dans différenciation des entérocytes en fonction des traitements et des porcs, pour lesquels le DON a une induit une différence significative à  $p < 0,05$  comparé au PBS. n(PBS)=6 ; n(BUT,DON,BUT\_DON)=5. **B** – Heatmap de l'expression de gènes impliqués dans la production de mucus et codant pour des peptides antimicrobiens en fonction des traitements et des porcs, pour lesquels le DON a une induit une différence significative à  $p < 0,05$  comparé au PBS. n(PBS)=6 ; n(BUT,DON,BUT\_DON)=5.

L'échelle de couleur correspond au niveau d'expression du gène. Les étoiles sont assignées aux gènes pour lesquels il y a une différence significative entre les groupes DON et BUT\_DON avec une valeur de  $p < 0,05$ .



### C. Etude des effets du butyrate sur le « stress ribotoxique »

Nous avons vu que le mode d'action du DON est dû en partie à sa ribotoxicité (Recharla et al. 2022; Garofalo et al. 2023). Il se lie au ribosome, empêche son fonctionnement et induit alors un « stress ribotoxique ». Notre objectif dans cette partie était de savoir si le butyrate permet d'atténuer les conséquences du « stress ribotoxique » ou si d'autres voies pourraient être impliquées. Pour cela nous avons utilisé de l'ANI qui est une autre ribotoxine que le DON (Garofalo et al. 2022).

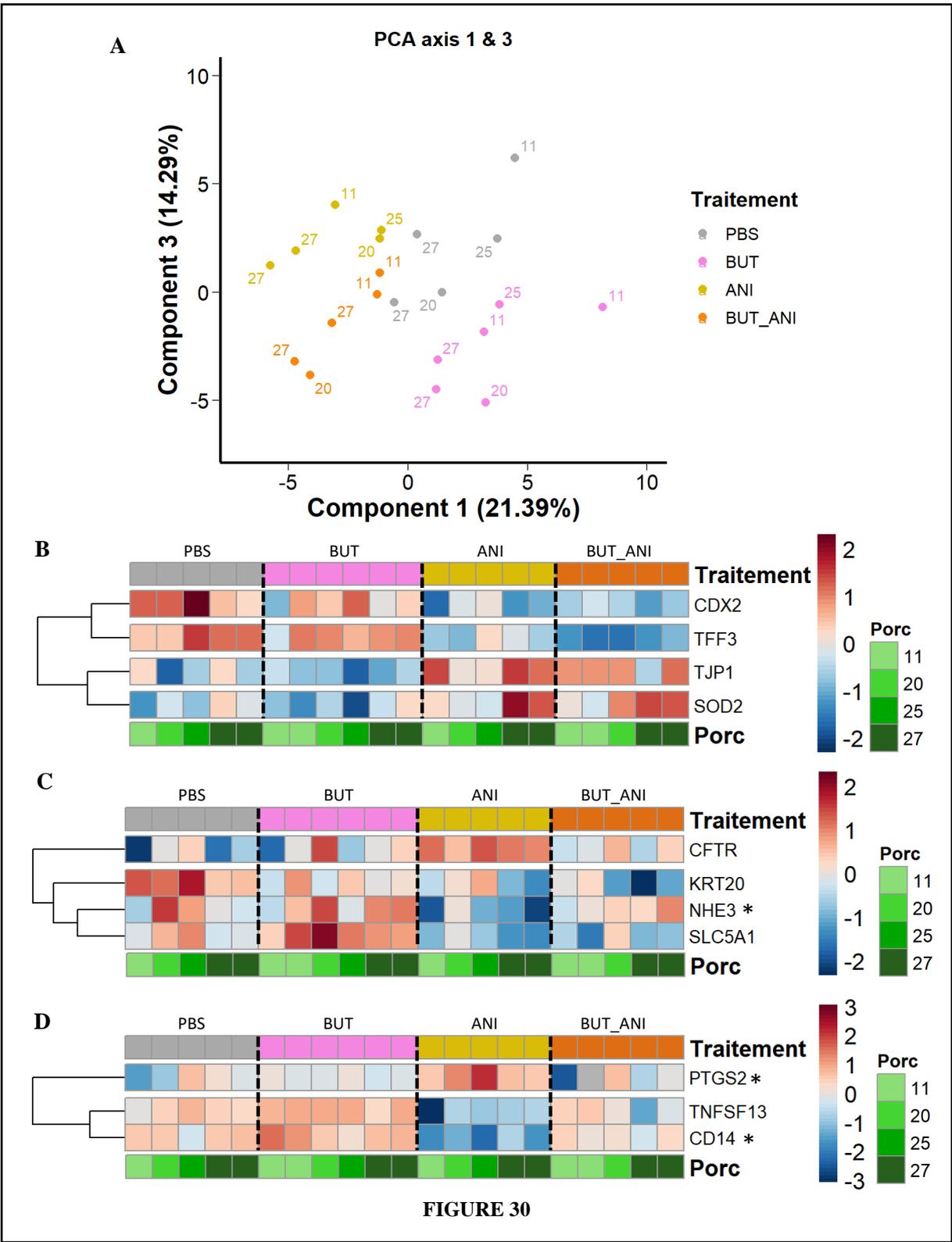
Une ACP a été réalisée à partir de l'expression des 62 gènes étudiés (Figure 30A). La composante 1 a mis en évidence l'effet du butyrate sur les profils d'expression de gènes. La composante 3 a mis en évidence l'effet de l'ANI sur les profils d'expression. La composante 2 était liée à des sources de variabilités non identifiées. De même que pour le DON, nous avons choisi de ne représenter que les gènes pour lesquels l'effet de l'ANI est significatif par rapport au PBS.

L'ANI n'a pas permis d'induire une augmentation significative de la perméabilité au FITC-dextran. On ne peut donc pas étudier les effets préventifs du butyrate, mais sur les individus présentant une augmentation de la perméabilité avec l'ANI on observe une tendance à la diminution induite par le butyrate (Figure 31A). Le butyrate a permis d'atténuer la diminution de la TEER induite par l'ANI (Figure 31B). Cependant, le butyrate n'a pas permis de réduire l'augmentation induite par l'ANI de l'expression du gène TJP1, codant pour une protéine de jonctions serrées (Figure 30B). En ce qui concerne l'expression des gènes impliqués dans la différenciation des différents types cellulaires, le butyrate a seulement permis d'atténuer la diminution de l'expression du gène NHE3 induite par l'ANI, marqueur de la différenciation des entérocytes (Figure 30C).

Le butyrate n'a pas permis d'atténuer la diminution de l'expression de CDX2 par l'ANI, le seul gène impliqué dans le renouvellement cellulaire qui est impacté par l'ANI (Figure 30B). De plus, la concentration de LDH dans le milieu de culture apical n'était pas modifiée par les différents traitements par rapport au contrôle (Figure 32). Enfin, le butyrate a permis de réduire l'augmentation de l'expression du gène PTGS2 induite par l'ANI, ainsi que d'atténuer la diminution de l'expression du gène CD14 par l'ANI, qui sont des gènes impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire (Figure 30D).

L'utilisation de l'ANI nous a permis de montrer que le traitement préventif de butyrate est efficace contre certains effets du « stress ribotoxique » car il permet d'atténuer les effets ce

celui-ci sur la perméabilité épithéliale et l'expression de quelques gènes impliqués dans diverses fonctions.

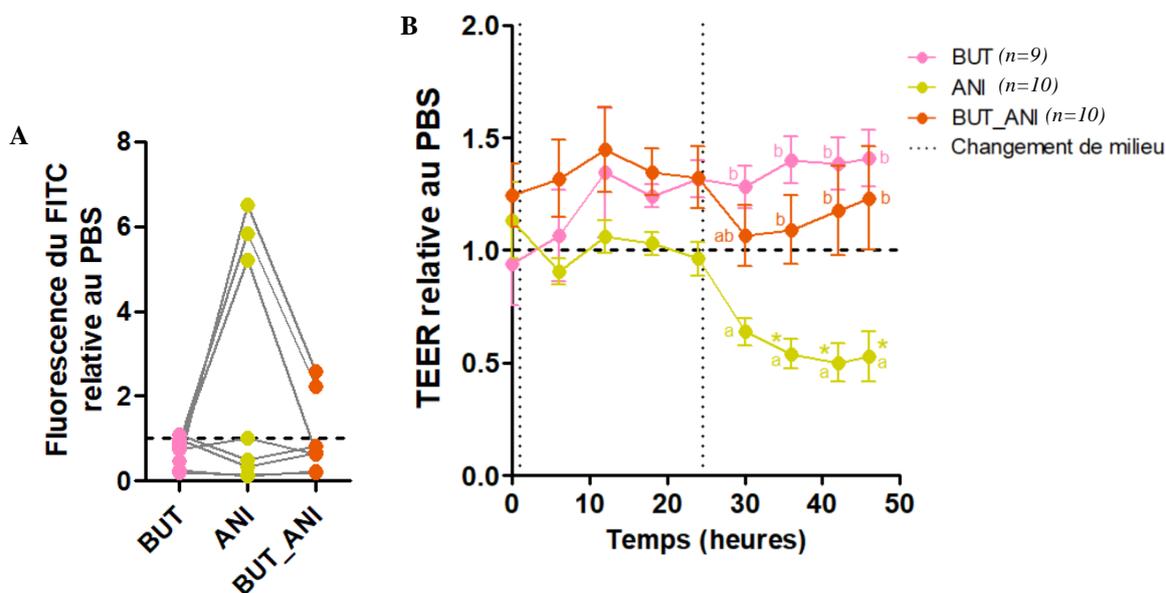


### FIGURE 30 : EFFETS DU BUTYRATE ET DE L'ANISOMYCINE SUR L'EXPRESSION DES GENES

Les monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de jéjunum de porcelets ont été traitées pendant 24h avec du butyrate ou du PBS puis pendant les 24 heures suivantes avec du PBS, du butyrate, de l'ANI ou du butyrate et de l'ANI.

**A** – Composantes 1 et 3 d'une ACP de l'expression de l'ensemble des 62 gènes étudiés en fonction du traitement. Le pourcentage de variance expliquée par la composante 1 est de 21,39 % et pour la composante 3 de 14,29 %. La composante 2 (non représentée) est liée à des sources de variances non identifiées. n(PBS,ANI,BUT\_ANI)=5; n(BUT)=6. Les numéros identifient le porcelet à l'origine des organoïdes. **B** – Heatmap de l'expression de divers gènes en fonction des traitements et des porcs, pour lesquels l'ANI a une induit une différence significative à  $p < 0,05$  comparé au PBS. n(PBS,ANI,BUT\_ANI)=5; n(BUT)=6. **C** – Heatmap de l'expression de gènes marqueurs de la différenciation des entérocytes en fonction des traitements et des porcs, pour lesquels l'ANI a une induit une différence significative à  $p < 0,05$  comparé au PBS. n(PBS,ANI,BUT\_ANI)=5; n(BUT)=6. **D** – Heatmap de l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire en fonction des traitements et des porcs, pour lesquels l'ANI a une induit une différence significative à  $p < 0,05$  comparé au PBS. n(PBS,ANI,BUT\_ANI)=5; n(BUT)=6.

L'échelle de couleur correspond au niveau d'expression du gène. Les étoiles sont assignées aux gènes pour lesquels il y a une différence significative entre les groupes ANI et BUT\_ANI avec une valeur de  $p < 0,05$ .

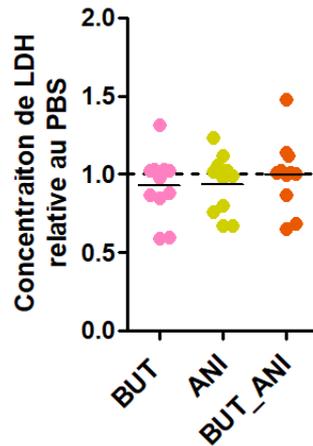


### FIGURE 31 : EFFETS DU BUTYRATE ET DE L'ANISOMYCINE SUR LA PERMEABILITE EPITHELIALE

Les monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de jéjunum de porcelets ont été traitées pendant 24h avec du butyrate ou du PBS puis pendant les 24 heures suivantes avec du PBS, du butyrate, de l'ANI ou du butyrate et de l'ANI.

**A** – Mesure de la perméabilité au FITC-dextran 4 kDa dans le milieu basal des monocouches de cellules dérivées d'organoïdes après 2h d'incubation à 37°C en fonction des traitements. n=8/groupe. Chaque ligne relie les échantillons d'un même porc pour les différentes conditions. **B** – Mesure en continu de la TEER de 0 à 48 heures de traitement en fonction des traitements.

Les résultats ont été exprimés relativement à la valeur mesurée dans le puits contrôle du même porcelet (traité seulement au PBS pendant 48 heures), qui est représenté par la ligne pointillée à  $y = 1$ . Une différence significative avec le groupe PBS avec une valeur de  $p < 0,05$  a été représentée par \*. Une différence significative entre deux groupes avec une valeur de  $p < 0,05$  a été représentée par des lettres différentes. Pour les mesures de la TEER qui sont dépendantes du temps, les conditions sont comparées entre elles pour chaque temps.



**FIGURE 32 : EFFETS DU BUTYRATE ET DE L'ANISOMYCINE SUR LES DOMMAGES CELLULAIRES**

Les monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de jéjunum de porcelets ont été traitées pendant 24h avec du butyrate ou du PBS puis pendant les 24 heures suivantes avec du PBS, du butyrate, de l'ANI ou du butyrate et de l'ANI.

Mesure de l'absorbance de la LDH dans le milieu apical des monocouches de cellules dérivées d'organoïdes en fonction des traitements. n=11/groupe.

Les résultats ont été exprimés relativement à la valeur mesurée dans le puits contrôle du même porcelet (traité seulement au PBS pendant 48 heures), qui est représenté par la ligne pointillée à  $y = 1$ . Une différence significative entre un groupe et le groupe PBS avec une valeur de  $p < 0,05$  a été représentée par \*. Une différence significative entre deux groupes avec une valeur de  $p < 0,05$  a été représentée par des lettres différentes.

### III. Discussion

#### A. Intérêt du modèle des monocouches dérivées d'organoïdes dans l'étude des effets du déoxynivalénol sur l'épithélium intestinal porcin

Nous avons montré que le DON induit un dysfonctionnement de la barrière épithéliale intestinale sur des monocouches dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets. En effet, le DON a induit une altération du rôle de barrière physique de l'épithélium intestinal car nous avons observé une augmentation de la perméabilité épithéliale (mesure de la TEER et perméabilité au FITC-dextran 4 kDa), comme attendu au vu des résultats obtenus sur des lignées cellulaires humaine Caco-2 et porcine IPEC-J1 ou sur des explants intestinaux *ex vivo* (Pinton et al. 2009). La différenciation en cellules en gobelet, qui produisent du mucus participant au rôle de barrière physique, a également été altérée par le DON car nous avons observé une modulation de l'expression des gènes marqueurs de ces cellules, ce qui suggère une diminution du nombre de cellules en gobelet comme observé *in vivo* (Bracarense et al. 2012). De plus, nous avons observé une diminution de l'expression du gène TFF3 en présence de DON, codant pour un peptide du mucus, ce qui est en accord avec des résultats obtenus sur des cellules humaines HT-29 (Graziani et al. 2019). Le DON a également induit une altération du rôle de barrière chimique de l'épithélium car nous avons observé des modifications de l'expression des gènes codant pour des peptides anti-microbiens, ce qui est en accord avec ce qui a été trouvé *in vivo* chez des porcelets (Lessard et al. 2015). Enfin, le DON a altéré les mécanismes de réponse immunitaire et d'équilibre redox ce qui est en accord avec les effets du DON montré *in vivo* chez des porcelets (Recharla et al. 2022; Bracarense et al. 2012; Lessard et al. 2015), comme par exemple les gènes PTGS2 et CCL20 dont l'expression est modulée par le DON. Cependant, le dysfonctionnement de la barrière épithéliale induite par le DON n'a pas provoqué de cytotoxicité sur les cellules des monocouches, ce qui permet d'étudier les caractéristiques de l'épithélium intestinal en présence de DON en dissociant ses effets de ceux induit par la mort cellulaire. En effet, en cas de mort cellulaire importante, une diminution de la mesure de la TEER par exemple pourrait être due à la présence de zones dépourvues de cellules dans le tapis cellulaire et non pas à une altération des protéines de jonction. Globalement, nous sommes donc parvenus à reproduire dans un nouveaux modèle certains effets du DON déjà décrits dans la littérature.

Notre étude des effets dose-réponse du DON nous a permis de montrer que 100  $\mu\text{M}$  est la concentration la plus pertinente pour l'étude des effets d'un dysfonctionnement épithélial sur notre modèle car aucun effet n'était observé à 5 et 10  $\mu\text{M}$  tandis que la concentration de 50  $\mu\text{M}$  affectait modérément l'expression des gènes sans induire de dysfonctionnement de la barrière

épithéliale. La concentration de 100  $\mu\text{M}$  de DON correspondrait à une estimation de 30 mg/kg de DON dans la ration (Pinton et al. 2009), ce qui est en accord avec les concentrations retrouvées dans les céréales, qui vont jusqu'à 50 mg/kg (Holanda, Kim 2021). Cette concentration de 100  $\mu\text{M}$  correspondrait à une intoxication aiguë ; sachant qu'une intoxication chronique correspondrait à des concentrations de 3 à 10  $\mu\text{M}$  (1 à 3 mg de DON / kg de nourriture) (Recharla et al. 2022), il pourrait être intéressant d'étudier l'effet de ces concentrations plus faibles sur les monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets pendant un temps plus long pour mimer ce type d'intoxication chronique. Nous nous attendions à observer des effets importants sur les monocouches avec une concentration de DON inférieure ou égale à 5  $\mu\text{M}$  étant donné les effets observés à cette concentration sur des explants intestinaux de porcelets (Kolf-Clauw et al. 2009) ou sur des lignées cellulaires (Pinton, Oswald 2014), sur lesquels le DON induit des modifications morphologiques. Cela pourrait s'expliquer par la plus grande viabilité de nos monocouches dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets qui ne sont pas du tout détériorées au bout des 72 heures de culture ici, en comparaison à la stabilité des explants intestinaux qui peuvent ne plus être viables au bout de 24 heures de culture (Randall, Turton, Foster 2011). Par ailleurs, il a été montré que les cellules différenciées sont plus résistantes au DON que les cellules immatures des lignées cellulaires (Luo et al. 2021). Les organoïdes sont composés de différents types cellulaires et ont probablement un niveau de différenciation plus important que les lignées cellulaires. C'est pourquoi il est cohérent de devoir utiliser une concentration de DON plus élevée afin d'observer des effets sur les monocouches dérivées des organoïdes. En effet, il a été montré qu'une concentration de 1  $\mu\text{M}$  de DON n'a pas d'effet délétère sur des organoïdes murins lorsqu'il est administré au pôle apical (Hanyu et al. 2020), alors que 1,39  $\mu\text{M}$  de DON induisent une augmentation de la perméabilité sur une lignée cellulaire Caco-2 (Akbari et al. 2014). Des concentrations élevées en DON sont donc nécessaires pour étudier ses effets sur les monocouches dérivées d'organoïdes, probablement en raison d'une exposition faite dans des conditions plus proches des conditions physiologiques dans ce modèle, dues à la différenciation cellulaire et au contrôle de la polarité lors de l'administration des composés.

Cependant, ce modèle présente des limites car nous avons fait face à différents problèmes de reproductibilité. Une importante variabilité a été observée entre les différents porcs en termes de TEER ou d'expression de gènes. Nous avons donc rapporté chaque valeur mesurée à celle du contrôle respectif pour chaque porc de façon à pouvoir comparer les porcs entre eux, et cela a également été pris en compte dans le modèle statistique (modèles mixtes avec facteurs aléatoires). Malgré cela, certains porcs ne présentent pas les mêmes réponses au DON que les

autres ; par exemple, l'expression du gène CLDN3 augmente pour le porc 12 à une concentration de 100  $\mu$ M de DON par rapport au PBS alors qu'elle est stable pour les autres porcs (Figure 16). La culture de monocouches dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets permet de conserver les phénotypes différents de chaque porc, ce qui est un atout pour prendre en compte la variabilité individuelle, mais un nombre de répétitions suffisant est alors nécessaire pour obtenir des résultats représentatifs et non des cas particuliers. Nous avons également observé une différence entre deux expériences différentes répétant pourtant les mêmes conditions. Par exemple, l'expression du gène CLDN2 est significativement modifiée par 100  $\mu$ M de DON lors de l'étude des effets du butyrate et du DON (Figure 24A) alors qu'elle ne l'est pas dans l'étude dose-réponse (Figure 16). La variabilité de réponse entre les porcs pourrait être responsable de ces différences étant donné que le nombre de porcs et leur identité est différente entre les deux expériences. Ces observations ouvrent d'importantes perspectives pour étudier grâce aux organoïdes les déterminants génétiques de la sensibilité aux mycotoxines ou à d'autres traitements.

## **B. Effets du déoxynivalénol et leur atténuation par le butyrate**

Nous avons montré que le DON induit une augmentation de l'expression des gènes codants pour des protéines de jonctions serrées, ce qui est probablement dû à un phénomène de compensation transcriptionnelle en réponse à la dégradation des protéines de jonctions cellulaires (Akbari et al. 2014). Pour confirmer cette hypothèse, une étude de l'expression protéique des cellules des monocouches est en cours en utilisant la méthode du Western Blot, pour les protéines de jonctions serrées occludine, ZO-1 et claudine 3 pour lesquelles on s'attend à retrouver une diminution du niveau d'expression par le DON et une atténuation de cet effet par le butyrate d'après nos résultats d'expression de gènes. Nous avons montré que le butyrate a atténué les effets délétères du DON sur la TEER, comme cela a déjà été montré sur un modèle de lignée cellulaire humaine HT-29-MTX (Nielsen et al. 2018). Le butyrate permet également d'atténuer les effets du DON sur la perméabilité au FITC-dextran 4 kDa, ce qui est cohérent avec les effets connus opposés du butyrate (Wang et al. 2018; Yan, Ajuwon 2017) et du DON (Lessard et al. 2015; Pinton et al. 2009). Cependant, le butyrate n'a permis d'atténuer les effets du DON que sur l'expression de 2 gènes, OCLN et TJP1, codant pour des protéines de jonctions serrées parmi les 7 gènes sur lesquels le DON avait un effet, ce qui est peu au vu des 9 gènes étudiés dans une étude précédente sur des cellules IPEC-J2 (Xue et al. 2023).

Nous avons montré que le DON induit une modulation de la réponse immunitaire innée dans l'épithélium, ce qui est cohérent avec la littérature (Recharla et al. 2022; Bracarense et al. 2012; Lessard et al. 2015). Le butyrate atténue les effets du DON sur plus de la moitié des gènes impliqués dans l'immunité dont l'expression est modulée par le DON, cette action sur la réponse immunitaire correspond aux résultats déjà montrés sur des foies de porcelets (Zong et al. 2023).

Nous avons montré que le DON induit une augmentation de l'expression des gènes marqueurs de la prolifération cellulaire, et le marquage des cellules en prolifération à l'EdU a montré que le DON a bloqué les effets du butyrate sur la prolifération. Cependant nous avons montré que le butyrate a induit une augmentation de la prolifération (marquage à l'EdU), nous nous serions donc attendus à observer une atténuation des effets du DON par le butyrate. Comme décrit dans l'introduction, les effets du butyrate ont un équilibre qui dépend de l'utilisation différente qu'en font les cellules prolifératives et différenciées (Salvi, Cowles 2021). Plus il y a de cellules différenciées, plus le butyrate sera utilisé par  $\beta$ -oxydation et n'exercera pas une action inhibitrice des HDACs, ce qui mène à une augmentation de la prolifération cellulaire (Salvi, Cowles 2021), comme observé sur notre marquage à l'EdU. Or nous avons vu que le DON réduit la différenciation dans notre modèle ce qui pourrait expliquer pourquoi le butyrate agit en tant qu'inhibiteur des HDACs et n'induit plus d'augmentation de la prolifération en présence de DON sur les monocouches dérivées d'organoïdes.

Nous avons montré que le DON induit une modification de la morphologie des cellules épithéliales – des contours cellulaires moins géométriques, une diminution de l'épaisseur du tapis cellulaire sachant que le degré de différenciation d'une cellule augmente avec son épaisseur (Altay et al. 2019), et une diminution de la taille des villosités – et modifie l'expression des gènes impliqués dans la différenciation, ce qui est cohérent avec des études précédentes (Pinton, Oswald 2014; Lessard et al. 2015). Le butyrate n'a pas permis d'atténuer les effets du DON sur la morphologie des cellules épithéliales, mais il a atténué les effets du DON sur la moitié des gènes étudiés impliqués dans la différenciation des entérocytes et de la production de mucus. L'atténuation partielle des effets du DON par le butyrate pourrait être expliquée par le fait que l'inhibition des HDACs par le butyrate est possible car le DON a réduit le nombre de cellules différenciées étant capable d'utiliser le butyrate, ce qui induit une modification de l'équilibre entre la prolifération et la différenciation cellulaire en faveur de la différenciation.

L'ensemble de ces résultats montre donc que le butyrate possède certains effets protecteurs contre les effets du DON mais toutes les fonctions étudiées dans notre modèle de monocouches dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets ne sont pas concernées.

### **C. Mécanismes pouvant intervenir dans les effets protecteurs du butyrate**

Pour mieux comprendre les interactions entre le butyrate et le DON, nous nous sommes intéressés aux effets du butyrate sur une autre ribotoxine : l'ANI. Nous avons montré que le butyrate permet de réduire la diminution de la TEER induite par l'ANI, ce qui est pas en accord avec les effets connus de l'ANI sur les cellules épithéliales intestinales qui réduit la TEER (Ungewiß et al. 2017) tandis que le butyrate l'augmente (Pearce et al. 2020; Gaudier et al. 2004; Feng et al. 2018). Cependant l'ANI n'a pas permis d'induire une augmentation de la perméabilité au FITC-dextran. Le butyrate a permis d'atténuer en partie les effets de l'ANI sur l'expression des gènes marqueurs de la différenciation et marqueurs de la réponse immunitaire – ce qui est cohérent avec les effets connus de l'ANI qui induit une augmentation de l'expression du gène COX2 (Shafer, Slice 2005) et de la sécrétion d'IL8 (Thorpe et al. 1999) tandis que le butyrate diminue la réponse inflammatoire (Yan, Ajuwon 2017). Le traitement préventif de butyrate permet seulement d'atténuer certains effets de l'ANI qui sont causés par son effet ribotoxique. Cela nous permet d'en conclure que le butyrate s'oppose à la ribotoxicité et que ce mécanisme pourrait être impliqué en partie dans son effet protecteur contre le DON. On suppose que le butyrate pourrait permettre de lever l'inhibition exercée par le DON sur la synthèse protéique. Pour confirmer cette idée, il serait possible d'étudier les effets du butyrate et du DON sur la synthèse protéique en utilisant la puromycine, un inhibiteur de la synthèse protéique, qui permet de marquer les protéines synthétisées. Cependant l'ANI modifie l'expression d'un faible nombre de gènes comparé à ceux qui sont impactés par le DON et ne permet pas d'induire une augmentation de la perméabilité au FITC-dextran pour tous les porcs étudiés. Il est possible que la concentration d'ANI utilisée soit trop faible : nous avons réalisé des mesures préalables avec des concentrations entre 12,6 pM et 1 µM d'ANI, au cours desquelles nous avons vérifié la viabilité de notre modèle (pas d'augmentation de l'activité de la LDH dans le milieu apical et maintien de l'intégrité du tapis cellulaire), mais on peut penser que la concentration de 1 µM est trop faible car les effets provoqués par l'ANI sont quantitativement moins importants que ceux du DON. Il est également possible que d'autres voies soient impliquées dans les effets du DON, comme par exemple les voies de signalisation liées à la MEC qui ne sont pas retrouvées dans les organoïdes.

Le butyrate est connu pour agir comme un inhibiteur des HDACs, ce qui induit une modification du profil d'expression génique de l'épithélium intestinal (Salvi, Cowles 2021). Nous avons utilisé de la trichostatine A (TSA), qui est un autre inhibiteur des HDACs, comme traitement préventif suivi du traitement avec 100  $\mu$ M de DON afin d'étudier dans quelle mesure l'inhibition des HDACs pourrait être impliquée dans l'atténuation des effets du butyrate. Nous avons utilisé la TSA à une concentration de 0,5  $\mu$ M comme une étude qui a été réalisée sur des cellules humaines T84 (Wang et al. 2020). Cependant certaines monocouches traitées avec de la TSA et une majorité de celles traitées avec de la TSA et du DON ont été complètement dégradées au terme des 48 heures de traitement. Il est possible que la concentration de TSA soit trop importante, il serait intéressant de réaliser une étude dose-réponse de la TSA afin de déterminer la concentration permettant d'observer les effets de la TSA sans induire de dommages cellulaires.

Si le butyrate n'agit pas en tant qu'inhibiteur des HDACs, nous avons vu qu'il va être utilisé par les cellules épithéliales via la  $\beta$ -oxydation mitochondriale (Salvi, Cowles 2021), ce qui pourrait contribuer aux effets bénéfiques observés, d'autant plus que le DON induit des dysfonctionnements mitochondriaux (Ren et al. 2020). Nous avons utilisé une technique d'imagerie basée sur l'utilisation des MitoTrackers<sup>TM</sup> permettant de marquer les mitochondries fonctionnelles, cependant le marquage n'est pas fonctionnel pour l'instant et des mises au point supplémentaires sont nécessaires. Nous avons également mesuré la respiration mitochondriale en utilisant la technologie Seahorse : pour cela il est nécessaire de cultiver les monocouches dans une plaque spécifique à l'appareil et ne permettant pas l'utilisation des transwells. Nous n'avons à ce jour pas trouvé des conditions de culture adéquates permettant de maintenir les monocouches durant les 72 heures nécessaires car l'absence de milieu au pôle basal réduit la différenciation des cellules épithéliales, l'équilibre est donc réorienté vers la prolifération des cellules et leur nombre étant trop important la monocouche se détache du fond des puits. Des essais supplémentaires seront nécessaires pour pouvoir utiliser cette technologie. Nous avons alors décidé de réaliser des qPCR pour analyser l'expression des gènes CPT1A, IDH2 et PCK2 – impliqués dans le métabolisme énergétique mitochondrial – ainsi que NRF2, PGC1 $\alpha$  et TFAM – impliqués dans la biogenèse mitochondriale – qui sont en cours. Les résultats préliminaires montrent que le DON et l'ANI perturbent l'expression de ces gènes, ce qui est cohérent avec les liens connus entre ribotoxicité et stress mitochondrial.

## **D. Applications en élevage porcin**

La filière porcine doit faire face à une augmentation de la quantité de céréales contaminées par le DON ce qui impacte la santé des porcs ainsi que l'équilibre financier des éleveurs (Auffray, Gouault 2023), c'est pourquoi l'étude des effets du DON est pertinente. Des nouvelles techniques de détection de la concentration de DON dans les urines des porcs sont en cours de développement afin d'étudier l'efficacité des potentiels traitements permettant de réduire les effets délétères du DON (Auffray, Gouault 2023). Cette méthode pourrait être utilisée pour valider l'utilisation d'un traitement préventif de butyrate en amont d'une intoxication aiguë au DON. L'objectif serait d'augmenter la quantité de butyrate dans la lumière intestinale des porcs ce qui est possible par l'ajout de butyrate dans la ration, sous forme enrobée pour améliorer l'appétence et ralentir son absorption, ou par l'ajout de probiotiques producteurs de butyrates, ou par l'ajout de fibres à partir desquelles les microorganismes produisent le butyrate.

## **E. Conclusion**

Notre étude nous a permis de montrer que 100  $\mu\text{M}$  de DON permettent d'induire un dysfonctionnement de la barrière épithéliale intestinale dans notre modèle de monocouches dérivées d'organoïdes intestinaux de porcelets. L'étude des effets d'un traitement préventif au butyrate ayant pour objectif d'atténuer les effets du DON a montré que ce traitement est efficace sur certaines fonctions : la perméabilité épithéliale, la réponse immunitaire et dans une moindre mesure la différenciation cellulaire. L'utilisation de la ribotoxine ANI nous a permis de montrer que le butyrate est efficace contre certains effets provoqués par la ribotoxicité, notamment sur la perméabilité épithéliale. L'utilisation d'un traitement préventif de butyrate chez les porcs pourrait donc être envisageable afin de lutter contre les effets d'une intoxication des porcs au DON.

## IV. Bibliographie

AGRESTE, 2023. Graph'Agri 2022. [en ligne]. 18 janvier 2023. [Consulté le 13 novembre 2023]. Disponible à l'adresse : <https://agreste.agriculture.gouv.fr/agreste-web/disaron/GraFra2022Integral/detail/>

AKBARI, Peyman, BRABER, Saskia, GREMMELS, Hendrik, KOELINK, Pim J., VERHEIJDEN, Kim A. T., GARSSSEN, Johan et FINK-GREMMELS, Johanna, 2014. Deoxynivalenol: a trigger for intestinal integrity breakdown. *The FASEB Journal*. 2014. Vol. 28, n° 6, pp. 2414-2429. DOI 10.1096/fj.13-238717.

ALTAY, Gizem, LARRAÑAGA, Enara, TOSI, Sébastien, BARRIGA, Francisco M., BATLLE, Eduard, FERNÁNDEZ-MAJADA, Vanesa et MARTÍNEZ, Elena, 2019. Self-organized intestinal epithelial monolayers in crypt and villus-like domains show effective barrier function. *Scientific Reports*. 12 juillet 2019. Vol. 9, n° 1, pp. 10140. DOI 10.1038/s41598-019-46497-x.

AUFFRAY, Paul et GOUAULT, Stéphane, 2023. Bilan d'activité 2022 de l'IFIP. *IFIP - Institut du porc* [en ligne]. 11 mai 2023. [Consulté le 22 novembre 2023]. Disponible à l'adresse : <https://ifip.asso.fr/actualites/bilan-dactivite-ifip-decouvrez-nos-travaux-de-recherche-et-innovation/>

BEAUMONT, Martin, BLANC, Fany, CHERBUY, Claire, EGIDY, Giorgia, GIUFFRA, Elisabetta, LACROIX-LAMANDÉ, Sonia et WIEDEMANN, Agnès, 2021. Intestinal organoids in farm animals. *Veterinary Research*. décembre 2021. Vol. 52, n° 1, pp. 33. DOI 10.1186/s13567-021-00909-x.

BEAUMONT, Martin, LENCINA, Corinne, BERTIDE, Allan, GALLO, Lise, BARILLY, Céline, MARRAUD, Christelle, CAUQUIL, Laurent, SAMSON, Arnaud et COMBES, Sylvie, 2023. The Early Life Microbiota Is Not a Major Factor Underlying the Susceptibility to Postweaning Diarrhea in Piglets. *Microbiology Spectrum*. 26 juin 2023. Vol. 11, n° 4, pp. e00694-23. DOI 10.1128/spectrum.00694-23.

BLUTT, Sarah E., 2018. The Next MacGyver: A Platform to Study Intestinal Organoids Using High-Throughput Computer-Driven Microinjection. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 23 juillet 2018. Vol. 6, n° 3, pp. 352-353. DOI 10.1016/j.jcmgh.2018.06.010.

BRACARENSE, Ana-Paula F. L., LUCIOLI, Joelma, GRENIER, Bertrand, DROCIUNAS PACHECO, Graziela, MOLL, Wulf-Dieter, SCHATZMAYR, Gerd et OSWALD, Isabelle P., 2012. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. *The British Journal of Nutrition*. juin 2012. Vol. 107, n° 12, pp. 1776-1786. DOI 10.1017/S0007114511004946.

CLAUS, R., GÜNTNER, D. et LETZGUSS, H., 2007. Effects of feeding fat-coated butyrate on mucosal morphology and function in the small intestine of the pig. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. août 2007. Vol. 91, n° 7-8, pp. 312-318. DOI 10.1111/j.1439-0396.2006.00655.x.

DOU, Xiuqing, GAO, Nan, LAN, Jing, HAN, Junlan, YANG, Yang et SHAN, Anshan, 2020. TLR2/EGFR Are Two Sensors for pBD3 and pEP2C Induction by Sodium Butyrate Independent of HDAC Inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 15 janvier 2020. Vol. 68, n° 2, pp. 512-522. DOI 10.1021/acs.jafc.9b06569.

ESKOLA, Mari, KOS, Gregor, ELLIOTT, Christopher T., HAJŠLOVÁ, Jana, MAYAR, Sultan et KRŠKA, Rudolf, 2020. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 7 septembre 2020. Vol. 60, n° 16, pp. 2773-2789. DOI 10.1080/10408398.2019.1658570.

FENG, Wenqian, WU, Yancheng, CHEN, Guangxin, FU, Shoupeng, LI, Bai, HUANG, Bingxu, WANG, Dali, WANG, Wei et LIU, Juxiong, 2018. Sodium Butyrate Attenuates Diarrhea in Weaned Piglets and Promotes Tight Junction Protein Expression in Colon in a GPR109A-Dependent Manner. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. 2018. Vol. 47, n° 4, pp. 1617-1629. DOI 10.1159/000490981.

GAROFALO, Marion, PAYROS, Delphine, OSWALD, Eric, NOUGAYRÈDE, Jean-Philippe et OSWALD, Isabelle P., 2022. The foodborne contaminant deoxynivalenol exacerbates DNA damage caused by a broad spectrum of genotoxic agents. *Science of The Total Environment*. 10 mai 2022. Vol. 820, pp. 153280. DOI 10.1016/j.scitotenv.2022.153280.

GAROFALO, Marion, PAYROS, Delphine, TAIEB, Frederic, OSWALD, Eric, NOUGAYRÈDE, Jean-Philippe et OSWALD, Isabelle P., 2023. From ribosome to ribotoxins: understanding the toxicity of deoxynivalenol and Shiga toxin, two food borne toxins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2023. Vol. 0, n° 0, pp. 1-13. DOI 10.1080/10408398.2023.2271101.

GAUDIER, E., JARRY, A., BLOTTIÈRE, H. M., DE COPPET, P., BUISINE, M. P., AUBERT, J. P., LABOISSE, C., CHERBUT, C. et HOEBLER, C., 2004. Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. décembre 2004. Vol. 287, n° 6, pp. G1168-G1174. DOI 10.1152/ajpgi.00219.2004.

GEHART, Helmuth et CLEVERS, Hans, 2019. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. janvier 2019. Vol. 16, n° 1, pp. 19-34. DOI 10.1038/s41575-018-0081-y.

GRAZIANI, Fabien, PINTON, Philippe, OLLEIK, Hamza, PUJOL, Ange, NICOLETTI, Cendrine, SICRE, Mehdi, QUINSON, Nathalie, AJANDOUZ, El Hassan, PERRIER, Josette, PASQUALE, Eric Di, OSWALD, Isabelle P. et MARESCA, Marc, 2019. Deoxynivalenol inhibits the expression of trefoil factors (TFF) by intestinal human and porcine goblet cells. *Archives of Toxicology*. 1 avril 2019. Vol. 93, n° 4, pp. 1039-1049. DOI 10.1007/s00204-019-02425-6.

HANYU, Hikaru, YOKOI, Yuki, NAKAMURA, Kiminori, AYABE, Tokiyoshi, TANAKA, Keisuke, UNO, Kinuko, MIYAJIMA, Katsuhiko, SAITO, Yuki, IWATSUKI, Ken, SHIMIZU, Makoto, TADAISHI, Miki et KOBAYASHI-HATTORI, Kazuo, 2020. Mycotoxin Deoxynivalenol Has Different Impacts on Intestinal Barrier and Stem Cells by Its Route of Exposure. *Toxins*. 24 septembre 2020. Vol. 12, n° 10, pp. 610. DOI 10.3390/toxins12100610.

HOLANDA, Debora Muratori et KIM, Sung Woo, 2021. Mycotoxin Occurrence, Toxicity, and Detoxifying Agents in Pig Production with an Emphasis on Deoxynivalenol. *Toxins*. 23 février 2021. Vol. 13, n° 2, pp. 171. DOI 10.3390/toxins13020171.

HU, Ping, ZONG, Qiufang, ZHAO, Yahui, GU, Haotian, LIU, YaYa, GU, Fang, LIU, Hao-Yu, AHMED, Abdelkareem A, BAO, Wenbin et CAI, Demin, 2022. Lactoferrin Attenuates Intestinal Barrier Dysfunction and Inflammation by Modulating the MAPK Pathway and Gut

Microbes in Mice. *The Journal of Nutrition*. 1 novembre 2022. Vol. 152, n° 11, pp. 2451-2460. DOI 10.1093/jn/nxac200.

ISLAM, Rafiqul, ZHOU, Ting, YOUNG, J. Christopher, GOODWIN, Paul H. et PAULS, K. Peter, 2012. Aerobic and anaerobic de-epoxydation of mycotoxin deoxynivalenol by bacteria originating from agricultural soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. janvier 2012. Vol. 28, n° 1, pp. 7-13. DOI 10.1007/s11274-011-0785-4.

KOLF-CLAUW, Martine, CASTELLOTE, Jessie, JOLY, Benjamin, BOURGES-ABELLA, Nathalie, RAYMOND-LETRON, Isabelle, PINTON, Philippe et OSWALD, Isabelle P., 2009. Development of a pig jejunal explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: Histopathological analysis. *Toxicology in Vitro*. 1 décembre 2009. Vol. 23, n° 8, pp. 1580-1584. DOI 10.1016/j.tiv.2009.07.015.

LESSARD, Martin, SAVARD, Christian, DESCHENE, Karine, LAUZON, Karoline, PINILLA, Vicente A., GAGNON, Carl A., LAPOINTE, Jérôme, GUAY, Frédéric et CHORFI, Younès, 2015. Impact of deoxynivalenol (DON) contaminated feed on intestinal integrity and immune response in swine. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*. juin 2015. Vol. 80, pp. 7-16. DOI 10.1016/j.fct.2015.02.013.

LI, Xin, WANG, Chunchun, ZHU, Jiang, LIN, Qian, YU, Minjie, WEN, Jiashu, FENG, Jie et HU, Caihong, 2022. Sodium Butyrate Ameliorates Oxidative Stress-Induced Intestinal Epithelium Barrier Injury and Mitochondrial Damage through AMPK-Mitophagy Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 29 janvier 2022. Vol. 2022, pp. 3745135. DOI 10.1155/2022/3745135.

LI, Yang, YANG, Ning, CHEN, Jianing, HUANG, Xin, ZHANG, Na, YANG, Shanshan, LIU, Guo et LIU, Guangliang, 2020. Next-Generation Porcine Intestinal Organoids: an Apical-Out Organoid Model for Swine Enteric Virus Infection and Immune Response Investigations. *Journal of Virology*. 14 octobre 2020. Vol. 94, n° 21, pp. e01006-20. DOI 10.1128/JVI.01006-20.

LI, Yingfeng, GAO, Huihui, WANG, Ru et XU, Qing, 2023. Deoxynivalenol in food and feed: Recent advances in decontamination strategies. *Frontiers in Microbiology*. 2023. Vol. 14, pp. 1141378. DOI 10.3389/fmicb.2023.1141378.

LIN, Ruqin, SUN, Yu, MU, Peiqiang, ZHENG, Ting, MU, Haibin, DENG, Fengru, DENG, Yiqun et WEN, Jikai, 2020. Lactobacillus rhamnosus GG supplementation modulates the gut microbiota to promote butyrate production, protecting against deoxynivalenol exposure in nude mice. *Biochemical Pharmacology*. 1 mai 2020. Vol. 175, pp. 113868. DOI 10.1016/j.bcp.2020.113868.

LIU, Han, ZHAO, Jing, ZHANG, Wenju et NIE, Cunxi, 2023. Impacts of sodium butyrate on intestinal mucosal barrier and intestinal microbial community in a weaned piglet model. *Frontiers in Microbiology*. 12 janvier 2023. Vol. 13, pp. 1041885. DOI 10.3389/fmicb.2022.1041885.

LUO, Su, TERCILOLO, Chloe, NEVES, Manon, PUEL, Sylvie, NAYLIES, Claire, LIPPI, Yannick, PINTON, Philippe et OSWALD, Isabelle P., 2021. Comparative sensitivity of proliferative and differentiated intestinal epithelial cells to the food contaminant, deoxynivalenol. *Environmental Pollution*. 15 mai 2021. Vol. 277, pp. 116818. DOI 10.1016/j.envpol.2021.116818.

MUSSARD, Eloïse, LENCINA, Corinne, BOUDRY, Gaëlle, ACHARD, Caroline S., KLOTZ, Christian, COMBES, Sylvie et BEAUMONT, Martin, 2023. Culture of Piglet Intestinal 3D Organoids from Cryopreserved Epithelial Crypts and Establishment of Cell Monolayers. *Journal of Visualized Experiments*. 10 février 2023. N° 192, pp. 64917. DOI 10.3791/64917.

NIELSEN, Ditte Søvnsø Gundelund, JENSEN, Bent Borg, THEIL, Peter Kappel, NIELSEN, Tina Skau, KNUDSEN, Knud Erik Bach et PURUP, Stig, 2018. Effect of butyrate and fermentation products on epithelial integrity in a mucus-secreting human colon cell line. *Journal of Functional Foods*. 1 janvier 2018. Vol. 40, pp. 9-17. DOI 10.1016/j.jff.2017.10.023.

PAN, Xiao, WHITTEN, Douglas A., WU, Ming, CHAN, Christina, WILKERSON, Curtis G. et PESTKA, James J., 2013. Early Phosphoproteomic Changes in the Mouse Spleen During Deoxynivalenol-Induced Ribotoxic Stress. *Toxicological Sciences*. 1 septembre 2013. Vol. 135, n° 1, pp. 129-143. DOI 10.1093/toxsci/kft145.

PAYROS, Delphine, ALASSANE-KPEMBI, Imourana, PIERRON, Alix, LOISEAU, Nicolas, PINTON, Philippe et OSWALD, Isabelle P., 2016. Toxicology of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms. *Archives of Toxicology*. décembre 2016. Vol. 90, n° 12, pp. 2931-2957. DOI 10.1007/s00204-016-1826-4.

PEARCE, Sarah C., WEBER, Gregory J., VAN SAMBEEK, Dana M., SOARES, Jason W., RACICOT, Kenneth et BREAUULT, David T., 2020. Intestinal enteroids recapitulate the effects of short-chain fatty acids on the intestinal epithelium. *PLoS ONE*. 2 avril 2020. Vol. 15, n° 4, pp. e0230231. DOI 10.1371/journal.pone.0230231.

PENG, Luying, HE, Zhenjuan, CHEN, Wei, HOLZMAN, Ian R. et LIN, Jing, 2007. Effects of Butyrate on Intestinal Barrier Function in a Caco-2 Cell Monolayer Model of Intestinal Barrier. *Pediatric Research*. janvier 2007. Vol. 61, n° 1, pp. 37-41. DOI 10.1203/01.pdr.0000250014.92242.f3.

PETERSON, Lance W. et ARTIS, David, 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology*. mars 2014. Vol. 14, n° 3, pp. 141-153. DOI 10.1038/nri3608.

PIERRON, Alix, ALASSANE-KPEMBI, Imourana et OSWALD, Isabelle P., 2016. Impact of two mycotoxins deoxynivalenol and fumonisin on pig intestinal health. *Porcine Health Management*. 14 septembre 2016. Vol. 2, n° 1, pp. 21. DOI 10.1186/s40813-016-0041-2.

PIERRON, Alix, MIMOUN, Sabria, MURATE, Leticia S., LOISEAU, Nicolas, LIPPI, Yannick, BRACARENSE, Ana-Paula F. L., SCHATZMAYR, Gerd, HE, Jian Wei, ZHOU, Ting, MOLL, Wulf-Dieter et OSWALD, Isabelle P., 2016. Microbial biotransformation of DON: molecular basis for reduced toxicity. *Scientific Reports*. 6 juillet 2016. Vol. 6, n° 1, pp. 29105. DOI 10.1038/srep29105.

PINTON, Philippe, NOUGAYRÈDE, Jean-Philippe, DEL RIO, Juan-Carlos, MORENO, Carolina, MARIN, Daniela E., FERRIER, Laurent, BRACARENSE, Ana-Paula, KOLF-CLAUW, Martine et OSWALD, Isabelle P., 2009. The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 15 mai 2009. Vol. 237, n° 1, pp. 41-48. DOI 10.1016/j.taap.2009.03.003.

PINTON, Philippe et OSWALD, Isabelle P., 2014. Effect of Deoxynivalenol and Other Type B Trichothecenes on the Intestine: A Review. *Toxins*. mai 2014. Vol. 6, n° 5, pp. 1615-1643. DOI 10.3390/toxins6051615.

PUBLICATIONS OFFICE OF THE EUROPEAN UNION, 2016. Commission Recommendation (EU) 2016/1319 of 29 July 2016 amending Recommendation 2006/576/EC as regards deoxynivalenol, zearalenone and ochratoxin A in pet food (Text with EEA relevance), C/2016/4863. *Publications Office of the EU* [en ligne]. 29 juillet 2016. [Consulté le 3 octobre 2023]. Disponible à l'adresse : <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/01c5c706-5877-11e6-89bd-01aa75ed71a1/language-en>

QIU, Yueqin, YANG, Jun, WANG, Li, YANG, Xuefen, GAO, Kaiguo, ZHU, Cui et JIANG, Zongyong, 2021. Dietary resveratrol attenuation of intestinal inflammation and oxidative damage is linked to the alteration of gut microbiota and butyrate in piglets challenged with deoxynivalenol. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 16 juin 2021. Vol. 12, n° 1, pp. 71. DOI 10.1186/s40104-021-00596-w.

RANDALL, Kevin J., TURTON, John et FOSTER, John R., 2011. Explant culture of gastrointestinal tissue: a review of methods and applications. *Cell Biology and Toxicology*. août 2011. Vol. 27, n° 4, pp. 267-284. DOI 10.1007/s10565-011-9187-5.

RECHARLA, Neeraja, PARK, Sungkwon, KIM, Minji, KIM, Byeonghyeon et JEONG, Jin Young, 2022. Protective effects of biological feed additives on gut microbiota and the health of pigs exposed to deoxynivalenol: a review. *Journal of Animal Science and Technology*. juillet 2022. Vol. 64, n° 4, pp. 640-653. DOI 10.5187/jast.2022.e40.

REN, Zhihua, GUO, Chaoyue, HE, Hongyi, ZUO, Zhicai, HU, Yanchun, YU, Shumin, ZHONG, Zhijun, LIU, Haifeng, ZHU, Ling, XU, Shengyu, DENG, Youtian, HU, Hui et DENG, Junliang, 2020. Effects of deoxynivalenol on mitochondrial dynamics and autophagy in pig spleen lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*. juin 2020. Vol. 140, pp. 111357. DOI 10.1016/j.fct.2020.111357.

SALERI, Roberta, BORGHETTI, Paolo, RAVANETTI, Francesca, CAVALLI, Valeria, FERRARI, Luca, DE ANGELIS, Elena, ANDRANI, Melania et MARTELLI, Paolo, 2022. Effects of different short-chain fatty acids (SCFA) on gene expression of proteins involved in barrier function in IPEC-J2. *Porcine Health Management*. 19 mai 2022. Vol. 8, n° 1, pp. 21. DOI 10.1186/s40813-022-00264-z.

SALVI, Pooja S. et COWLES, Robert A., 2021. Butyrate and the Intestinal Epithelium: Modulation of Proliferation and Inflammation in Homeostasis and Disease. *Cells*. juillet 2021. Vol. 10, n° 7, pp. 1775. DOI 10.3390/cells10071775.

SATO, Toshiro, VRIES, Robert G., SNIPPERT, Hugo J., VAN DE WETERING, Marc, BARKER, Nick, STANGE, Daniel E., VAN ES, Johan H., ABO, Arie, KUJALA, Pekka, PETERS, Peter J. et CLEVERS, Hans, 2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. mai 2009. Vol. 459, n° 7244, pp. 262-265. DOI 10.1038/nature07935.

SHAFER, Lindsay M. et SLICE, Lee W., 2005. Anisomycin induces COX-2 mRNA expression through p38MAPK and CREB independent of small GTPases in intestinal epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 30 septembre 2005. Vol. 1745, n° 3, pp. 393-400. DOI 10.1016/j.bbamcr.2005.07.002.

THORPE, C. M., HURLEY, Bryan P., LINCICOME, Lisa L., JACEWICZ, Mary S., KEUSCH, Gerald T. et ACHESON, David W. K., 1999. Shiga Toxins Stimulate Secretion of Interleukin-8 from Intestinal Epithelial Cells. *Infection and Immunity*. novembre 1999. Vol. 67, n° 11, pp. 5985-5993.

UNGEWISS, Hanna, VIELMUTH, Franziska, SUZUKI, Shintaro T., MAISER, Andreas, HARZ, Hartmann, LEONHARDT, Heinrich, KUGELMANN, Daniela, SCHLEGEL, Nicolas et WASCHKE, Jens, 2017. Desmoglein 2 regulates the intestinal epithelial barrier via p38 mitogen-activated protein kinase. *Scientific Reports*. 24 juillet 2017. Vol. 7, n° 1, pp. 6329. DOI 10.1038/s41598-017-06713-y.

VAN DER FLIER, Laurens G. et CLEVERS, Hans, 2009. Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annual Review of Physiology*. 1 mars 2009. Vol. 71, n° 1, pp. 241-260. DOI 10.1146/annurev.physiol.010908.163145.

VAN DER HEE, Bart, MADSEN, Ole, VERVOORT, Jacques, SMIDT, Hauke et WELLS, Jerry M., 2020. Congruence of Transcription Programs in Adult Stem Cell-Derived Jejunum Organoids and Original Tissue During Long-Term Culture. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2 juillet 2020. Vol. 8, pp. 375. DOI 10.3389/fcell.2020.00375.

VERDILE, N., MIRMAHMOUDI, R., BREVINI, T. A. L. et GANDOLFI, F., 2019. Evolution of pig intestinal stem cells from birth to weaning. *Animal*. 1 janvier 2019. Vol. 13, n° 12, pp. 2830-2839. DOI 10.1017/S1751731119001319.

WANG, Chun Chun, WU, Huan, LIN, Fang Hui, GONG, Rong, XIE, Fei, PENG, Yan, FENG, Jie et HU, Cai Hong, 2018. Sodium butyrate enhances intestinal integrity, inhibits mast cell activation, inflammatory mediator production and JNK signaling pathway in weaned pigs. *Innate Immunity*. janvier 2018. Vol. 24, n° 1, pp. 40-46. DOI 10.1177/1753425917741970.

WANG, Shuai, ZHANG, Cong, YANG, Jiacheng, WANG, Xu, WU, Kuntan, ZHANG, Beiyu, ZHANG, Jiakai, YANG, Ao, RAJPUT, Shahid Ali et QI, Desheng, 2020. Sodium Butyrate Protects the Intestinal Barrier by Modulating Intestinal Host Defense Peptide Expression and Gut Microbiota after a Challenge with Deoxynivalenol in Weaned Piglets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 15 avril 2020. Vol. 68, n° 15, pp. 4515-4527. DOI 10.1021/acs.jafc.0c00791.

WU, Shengru, LIU, Yanli, DUAN, Yongle, WANG, Fangyuan, GUO, Fangshen, YAN, Fang, YANG, Xiaojun et YANG, Xin, 2018. Intestinal toxicity of deoxynivalenol is limited by supplementation with *Lactobacillus plantarum* JM113 and consequentially altered gut microbiota in broiler chickens. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2018. Vol. 9, pp. 74. DOI 10.1186/s40104-018-0286-5.

XIAO, Yeyi, WANG, Jie, WANG, Jingneng, WANG, Haifei, WU, Shenglong et BAO, Wenbin, 2022. Analysis of the roles of the Notch1 signalling pathway in modulating deoxynivalenol cytotoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. novembre 2022. Vol. 246, pp. 114183. DOI 10.1016/j.ecoenv.2022.114183.

XUE, Dongfang, CHENG, Yating, PANG, Tiantian, KUAI, Yunyi, AN, Yu, WU, Kuntan, LI, Yuqing, LAI, Mengyu, WANG, Bihan et WANG, Shuai, 2023. Sodium butyrate alleviates deoxynivalenol-induced porcine intestinal barrier disruption by promoting mitochondrial homeostasis via PCK2 signaling. *Journal of Hazardous Materials*. 5 octobre 2023. Vol. 459, pp. 132013. DOI 10.1016/j.jhazmat.2023.132013.

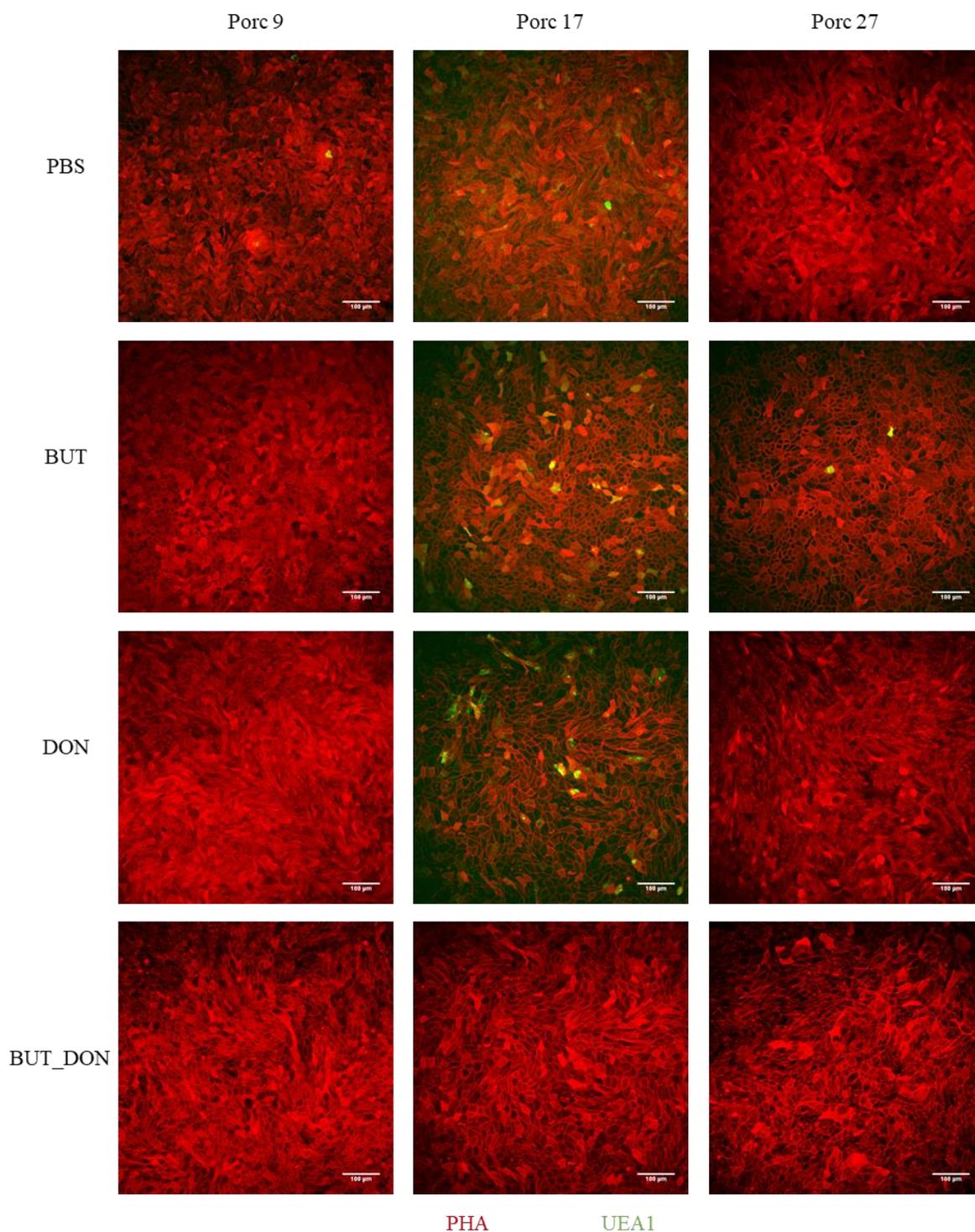
YAN, Hui et AJUWON, Kolapo M., 2017. Butyrate modifies intestinal barrier function in IPEC-J2 cells through a selective upregulation of tight junction proteins and activation of the Akt signaling pathway. KOVAL, Michael (éd.), *PLOS ONE*. 27 juin 2017. Vol. 12, n° 6, pp. e0179586. DOI 10.1371/journal.pone.0179586.

ZONG, Qiufang, LI, Kaiqi, QU, Huan, HU, Ping, XU, Chao, WANG, Haifei, WU, Shenglong, WANG, Shuai, LIU, Hao-Yu, CAI, Demin et BAO, Wenbin, 2023. Sodium Butyrate Ameliorates Deoxynivalenol-Induced Oxidative Stress and Inflammation in the Porcine Liver via NR4A2-Mediated Histone Acetylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 12 juillet 2023. Vol. 71, n° 27, pp. 10427-10437. DOI 10.1021/acs.jafc.3c02499.

ZONG, Qiufang, QU, Huan, ZHAO, Yahui, LIU, Haoyu, WU, Shenglong, WANG, Shuai, BAO, Wenbin et CAI, Demin, 2022. Sodium butyrate alleviates deoxynivalenol-induced hepatic cholesterol metabolic dysfunction via ROR $\gamma$ -mediated histone acetylation modification in weaning piglets. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 23 décembre 2022. Vol. 13, n° 1, pp. 133. DOI 10.1186/s40104-022-00793-1.

## Annexes

### Annexe 1 – Etude de la morphologie des cellules des monocouches de cellules dérivées d'organoïdes



Les monocouches de cellules dérivées d'organoïdes intestinaux de jéjunum de porcelets ont été traitées pendant 24h avec du butyrate ou du PBS puis pendant les 24 heures suivantes avec du PBS, du butyrate, du DON ou du butyrate et du DON.

Observations au microscope confocal (intensité maximale) de monocouches de porcelets en fonction des traitements, barre d'échelle de 100 µm. Marquage rouge de l'actine par la PHA et marquage vert des glycoprotéines (mucines) par UEA1. n=3/groupe.

## **Annexe 2 – Protocole de culture des organoïdes et des monocouches**

### Solutions commerciales

- DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate (Gibco 31966047), stocker à 4°C
- SVF (GIBCO 10270-106), stocker à -20°C
- Penicilin/streptomycine (P/S) (sigma P4333-100ML), stocker à -20°C
- Enzyme Express (1X) TrypLE™, rouge de phénol (Gibco 12605-010), stocker à température ambiante
- PBS sans Ca/Mg, (GIBCO 10010-015), stocker à 4°C
- Intesticult organoid growth medium human (Stem Cell Catalog #06010), stocker à -20°C
- Primocin (InvivoGen, ant-pm-05), stocker à -20°C
- DMSO, stocker à température ambiante

### Solutions à préparer

#### - **DMEM complet (DMEMc)**

Dans une bouteille de 500 mL de DMEM : ajouter 50 mL de SVF (10%) et 5 mL de P/S (1%)

Homogénéiser et aliquoter par tubes de 50 mL

Stocker à 4°C

#### - **Intesticult complet**

Référence : Stem Cell Catalog #06010

Décongeler les deux bouteilles « basal medium » et « organoid supplement » à température ambiante

Après homogénéisation par agitation, verser les 50 mL de « organoid supplement » dans la bouteille « basal medium » et mélanger

Ajouter 1 mL de pénicilline/streptomycine (1%)

Ajouter 200 µL de primocin (dilution 1:500, concentration finale 100 µg/mL)

Conserver à 4°C une semaine

#### - **Matrigel**

Référence : Matrice Corning Matrigel®, tumeur souris HSC (Corning 354234)

Décongeler le Matrigel à 4°C (frigo) une nuit

Sur glace et sous PSM, faire des aliquots de 500 µL dans des tubes de 2 mL froids avec des cônes froids (préalablement placés à -20°C). Attendre que le Matrigel redescende dans le cône avant d'éjecter.

Stocker à -20°C

Attention : toujours garder le Matrigel sur glace sinon il polymérise

- **Y27632 10 mM (1000X)**

Référence : ROCK inhibitor Y27632 (ATCC, ACS-3030)

Ajouter 3 mL d'eau stérile au vial contenant 10 mg de Y27632 et mélanger par pipetage

Filtrer 0.22 µM, Faire des aliquots de 50 µL

Stocker à -20°C (les aliquots décongelés peuvent être conservés 2 semaines à 4°C)

- **Collagène (1 mg /mL, 20X)**

Référence : Sigma C5533-5MG

Préparer une solution d'acide acétique 0.5 M (302 µL d'acide acétique pur dans 10 mL d'eau, filtrer à 0.22 µM)

Ajouter 5 mL d'acide acétique 0.5 M aux 5 mg de collagène - sur glace, laisser dissoudre

Aliquoter par 500 µL

Stocker à -20°C

I - Décongélation d'organoïdes d'iléon de porcelet allaité

A préparer la veille de la décongélation :

- Mettre le matrigel (400 µL) à décongeler à 4°C
- Placer des cônes à -20°C
- Placer une plaque 48 puits à 37°C

Le jour de la décongélation :

- Aller chercher de la glace
- Mettre l'Intesticult complet à température ambiante

Protocole :

- Mettre à décongeler dans le bain marie à 37 °C le cryotube contenant les organoïdes de jéjunum de porcelet de 21 jours. Passer directement de la carboglace au bain marie
- Immédiatement après la décongélation, transférer le contenu du cryotube dans un tube falcon 15 mL
- Centrifuger : 300 g, 5 min

- Resuspendre le culot d'organoïdes dans 400 µL de Matrigel (sur glace), faire 10 allers-retours sans faire de bulles
- Déposer avec des cônes froids 25 µL de Matrigel contenant les organoïdes dans les puits d'une plaque 48 puits préchauffée
- Laisser polymériser 15 min à 37°C
- Ajouter 250 µL par puits de milieu Intesticult complet
- Changer le milieu tous les 2-3 jours
- Passer les organoïdes après 3-5 jours de culture en fonction de la morphologie

## II - Passage des organoïdes

Préparation :

- Mettre le matrigel à décongeler à 4°C
- Placer des cônes P1000 et P200 à -20°C
- Placer deux plaques 24 puits à 37°C
- Aller chercher de la glace
- Mettre à chauffer au bain marie au moins 30 min :
  - o PBS
  - o TrypLE
- Mettre l'Intesticult complet à température ambiante

Protocole :

- Eliminer le milieu des puits à la pompe
- Dans les puits à passer, ajouter 250 µL de PBS chaud puis retirer le PBS à la pompe
- Ajouter 250 µL de TrypLE (37°C) dans chacun des puits
- Gratter le Matrigel avec le cône puis homogénéiser à la P1000 en faisant quelque allers-retours (sans faire de bulle)
- Incuber 5 min à 37 °C dans l'incubateur CO2
- Homogénéiser par pipetage (10 allers-retours), vérifier au microscope la dissociation des organoïdes en fragments, recommencer l'étape de dissociation par pipetage si nécessaire
- Ajouter 500 µL de DMEMc froid dans chaque puits pour arrêter la digestion
- Regrouper le contenu des puits dans un tube de 15 mL
- Centrifuger : 500 g, 4°C, 5 min
- A partir de cette étape travailler sur glace**
- Éliminer le surnageant

- Resuspendre le culot dans 500  $\mu\text{L}$  de DMEMc froid
- Compter les cellules dans 10  $\mu\text{L}$  dilué  $\frac{1}{2}$  dans le bleu trypan
- Calculer le volume correspondant au nombre souhaité de cellules :

	1 puits (plaque 24 puits)	48 puits (2 plaques)
Nombre de cellules	3 000	$1.44 \cdot 10^5$

- Si le volume est supérieur à 50  $\mu\text{L}$  :
  - o Transférer dans un tube de 15 mL et centrifuger (500 g, 4°C, 5 min)
  - o Eliminer le surnageant et resuspendre dans le volume approprié de DMEMc froid (cf tableau)
- Si le volume est inférieur à 50  $\mu\text{L}$  :
  - o Transférer directement les cellules dans le volume approprié de DMEMc froid (cf tableau)
- Homogénéisez à la pipette
- Ajouter avec un cône froid le volume approprié de Matrigel (cf tableau)
- Resuspendre les cellules (10 allers-retours sans faire de bulles) sur glace et avec des cônes froids

	1 puits (plaque 24 puits)	48 puits (2 plaques)
Volume de DMEMc froid ( $\mu\text{L}$ )	16,7	800
Volume de Matrigel ( $\mu\text{L}$ )	33,3	1600

- Déposer 50  $\mu\text{L}$  par puits (3000 cellules) dans deux plaques 24 puits préchauffées à 37°C
- Laisser polymériser 30 min à 37°C
- Dans chaque puits, ajouter 500  $\mu\text{L}$  d'Intesticult complet à température ambiante dans tous les puits
- Mettre à incuber à 37°C
- Changer le milieu tous les 2-3 jours

### III – Ensemencement des transwells (2 plaques de 24 puits permettent d'ensemencer 12 transwells)

Préparation :

- Aller chercher de la glace
- Mettre la TrypLE à chauffer au bain marie au moins 30 min
- Mettre l'Intesticult complet à température ambiante :
  - o Intesticult complet

- SVF
- Y27632 10 mM

Coating des transwells :

- Mettre à décongeler un aliquot de collagène
- Diluer 1:20 (concentration finale 50 µg/mL) : 100 µL de collagène dans 1900 µL de PBS froid
- Ajouter 150 µL de collagène dilué dans 13 inserts placés dans une plaque de 24 puits (dont un contrôle négatif sans cellules)
- Incuber à 37°C pendant 2 heures (ou la veille)

Ensemencement des transwells : **travailler sur glace**

- Gratter les dômes de Matrigel dans le milieu, faire quelques allers-retours et transférer sur glace dans un tube de 15 mL contenant 5 mL de DMEMc froid (il faut préparer 2 tubes pour une plaque de 24 puits)
- Centrifuger : 500 g, 4°C, 5 min
- Éliminer le surnageant au-dessus du Matrigel
- Homogénéiser à la pipette P1000 pour casser le Matrigel
- Centrifuger : 500 g, 4°C, 5 min
- Éliminer le surnageant au-dessus du culot de cellules
- Resuspendre le culot dans 1 mL de TrypLE + Y27632 10 µM (1µL de Y27 10 mM par mL de TrypLE)
- Incuber au bain marie 5 min 37°C
- Homogénéiser à la pipette P1000
- Incuber au bain marie 5 min 37°C
- Homogénéiser à la pipette P1000
- Vérifier la dissociation en prélevant 10 µL de la solution – il faut obtenir une majorité de cellules isolées. Répéter l'étape d'incubation-dissociation si nécessaire
- Ajouter 4 mL de DMEMc froid pour arrêter la dissociation
- Centrifuger : 500 g, 4°C, 5 min
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 500 µL de DMEMc froid
- Compter les cellules dans 10 µL dilué ½ dans le bleu trypan
- Calculer le volume correspondant au nombre souhaité de cellules (cf tableau)

	1 transwell	13 transwells (12 + 1 marge)
--	-------------	------------------------------

Nombre de cellules	2.5 10 <sup>5</sup>	3.25 10 <sup>6</sup>
--------------------	---------------------	----------------------

- Transférer ce volume dans un tube de 15 mL et centrifuger (500 g, 4°C, 5 min)
- Eliminer le collagène dilué des transwells avec une pince et une pipette et laisser sécher sous le PSM
- Transférer les transwells dans le cellZscope
- Préparer le milieu de culture (cf tableau)

	1 transwell	14 transwells (12 + 1 sans cellules + 1 marge)
Intesticult complet (µL)	936	13 200
Y27632 (µL)	1.17	16,5
SVF (µL)	234	3 300

- Après la centrifugation des cellules, éliminer le surnageant et resuspendre chaque culot dans 400 µL de milieu de culture par transwell  
Pour 13 transwells : 5200 µL
- Homogénéiser à la pipette et déposer 400 µL par transwell au pôle apical
- Ajouter au pôle basal 770 µL de milieu de culture
- Incuber à 37°C et mesurer la TEER avec le CellZscope

**Auteur :** Alberge Julie, ENVT, 2023

## **ÉVALUATION DES EFFETS DU BUTYRATE SUR LA BARRIÈRE ÉPITHÉLIALE INTESTINALE EN PRÉSENCE DE DEOXYNIVALENOL DANS UN MODÈLE D'ORGANOÏDES DE PORCELETS**

### **Résumé**

Les porcs sont fréquemment exposés au déoxynivalénol (DON), une mycotoxine retrouvée dans les céréales mal conservées et connue pour induire un dysfonctionnement de la barrière intestinale. L'objectif de cette étude était d'évaluer si les effets du DON sur la barrière épithéliale intestinale pouvaient être atténués par un traitement préventif par le butyrate, un métabolite microbien connu pour ses effets protecteurs. Notre modèle de monocouches dérivées d'organoïdes de jéjunum de porcelets nous a permis de reproduire *in vitro* la dysfonction de la barrière épithéliale induite par le DON à une concentration de 100 µM. Le butyrate (1 mM) a permis d'atténuer certains effets du DON et de l'anisomycine, une autre ribotoxine, suggérant que les effets protecteurs du butyrate pourraient être liés à une atténuation du « stress ribotoxique ». Nos résultats ouvrent la voie à l'utilisation du butyrate comme une stratégie préventive de la toxicité du DON chez le porcelet.

**Mots clés :** porcelet, organoïdes, monocouches, épithélium intestinal, déoxynivalénol, butyrate

---

## **ASSESSMENT OF THE EFFECTS OF BUTYRATE ON THE INTESTINAL EPITHELIAL BARRIER IN THE PRESENCE OF DEOXYNIVALENOL IN A PIGLET ORGANOID MODEL**

### **Summary**

Pigs are frequently exposed to deoxynivalenol (DON), a mycotoxin found in improperly stored cereals and known to induce a dysfunction of the intestinal barrier. The aim of this study was to assess whether the effects of DON on the intestinal epithelial barrier could be attenuated by a preventive treatment with butyrate, a microbial metabolite known to improve the intestinal epithelial barrier. Our model of monolayers derived from piglet jejunum organoids allowed us to reproduce *in vitro* the dysfunction of the epithelial barrier induced by DON at a concentration of 100 µM. Butyrate (1 mM) attenuated some effects of DON and anisomycin, another ribotoxin, suggesting that the protective effects of butyrate could be linked to an attenuation of 'ribotoxic stress'. Our results pave the way for the use of butyrate as a preventive strategy against DON toxicity in piglets.

**Keywords:** piglet, organoids, monolayers, intestinal epithelium, deoxynivalenol, butyrate