



**HAL**  
open science

# **Diversité structurale des oligosaccharides du lait et liens fonctionnels avec les capacités métaboliques des bactéries commensales et la réponse immunitaire intestinales chez le porc et le lapin**

Mathilde Rumeau

## ► To cite this version:

Mathilde Rumeau. Diversité structurale des oligosaccharides du lait et liens fonctionnels avec les capacités métaboliques des bactéries commensales et la réponse immunitaire intestinales chez le porc et le lapin. Biologie animale. Université de Toulouse, 2025. Français. ⟨NNT : 2025TLSEP072⟩. ⟨tel-05304492⟩

**HAL Id: tel-05304492**

**<https://theses.hal.science/tel-05304492v1>**

Submitted on 8 Oct 2025

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.



HAL Authorization

# Doctorat de l'Université de Toulouse

préparé à Toulouse INP

---

Diversité structurale des oligosaccharides du lait et liens fonctionnels avec les capacités métaboliques des bactéries commensales et la réponse immunitaire intestinales chez le porc et le lapin

---

Thèse présentée et soutenue, le 18 septembre 2025 par

**Mathilde RUMEAU**

**École doctorale**

SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries

**Spécialité**

Infectiologie, Physiopathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

**Unité de recherche**

GenPhySE- Unité Génétique, Physiologie et Systèmes d'Elevage

**Thèse dirigée par**

Sylvie COMBES et Christelle KNUDSEN

**Composition du jury**

Mme Vassilia THEODOROU, Présidente, El Purpan

M. Thomas CLAVEL, Rapporteur, Uniklinikum Aachen

Mme Marie BODINIER, Rapporteur, INRAE Pays de la Loire

M. Lionel RIGOTTIER-GOIS, Examineur, INRAE Île-de-France - Jouy-en-Josas-Antony

Mme Sylvie COMBES, Directrice de thèse, INRAE Occitanie-Toulouse

**Membres invités**

Mme Christelle KNUDSEN, INRAE Occitanie-Toulouse



## **SERMENT DES DOCTEURS/ THE DOCTORAL OATH**

“En présence de mes pairs.

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

« In the presence of my peers.

With the completion of my doctorate in [research field], in my quest for knowledge, I have carried out demanding research, demonstrated intellectual rigour, ethical reflection, and respect for the principles of research integrity. As I pursue my professional career, whatever my chosen field, I pledge, to the greatest of my ability, to continue to maintain integrity in my relationship to knowledge, in my methods and in my results.



## Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier Marie Bodinier (INRAE Pays de la Loire, unité BIA) et Thomas Clavel (Hôpital universitaire RWTH, Aachen, Allemagne) d'avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Lionel Rigottier-Gois (INRAE Jouy-en-Josas, unité MICALIS) et Vassilia Theodorou (INRAE Occitanie Toulouse, unité TOXALIM) pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie sincèrement les membres de mon comité de thèse, Gaëlle Boudry, Hélène Daniels, Rebeca Martín Rosique et Claire Nédellec pour leurs conseils, leur aide et la richesse de nos échanges.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance à mes directrices de thèse, Sylvie Combes et Christelle Knudsen, pour leur confiance, leur implication et leur disponibilité. Merci Sylvie, pour ton enthousiasme à toute épreuve, tes conseils avisés et tout ce que tu m'as transmis au fil de ces années, tant sur le plan scientifique qu'humain. J'ai particulièrement apprécié de travailler avec toi et de contribuer au projet HoloOLIGO. Merci également à ma co-directrice de thèse Christelle, pour m'avoir donné les clés pour appréhender l'immunologie avec rigueur et passion, et pour m'avoir transmis des bases scientifiques solides.

Je remercie Juliette Riquet, directrice de l'unité GenPhySE (INRAE Occitanie Toulouse) de m'avoir permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions. Je remercie également l'ensemble des membres de l'ANR HoloOLIGO avec qui j'ai eu le plaisir de travailler. Ce fut une expérience particulièrement enrichissante de pouvoir échanger avec des experts issus de disciplines complémentaires. Je tiens à adresser des remerciements particuliers à Louise Deléger, Claire Nédellec, Valentin Loux, Robert Bossy, Mouhamadou Ba et François Fenaille pour le travail effectué dans le cadre du premier workpackage de ce projet. Merci également à Agnès Girard et Sophie Aubin pour leur implication et leurs conseils éclairés. Je tiens à remercier le métaprogramme Holoflux, sans lequel la réalisation de cette thèse n'aurait pas pu se dérouler dans des conditions aussi favorables.

Je remercie l'école doctorale SEVAB, et en particulier Dominique Pantalacci pour sa disponibilité, sa réactivité et son accompagnement tout au long de ces années. Merci également à l'école internationale de recherche d'Agreenium (EIR-A) pour m'avoir offert l'opportunité de participer à deux séminaires particulièrement enrichissants, tant sur le plan scientifique qu'humain, et pour m'avoir permis de réaliser un séjour dans un laboratoire étranger.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à l'équipe allemande AG Hornef de l'institut de microbiologie médicale de l'université RWTH, pour m'avoir accueillie pendant trois mois. Merci au Professeur Hornef et à Natalia pour votre encadrement, votre disponibilité et vos nombreux conseils. Merci également à Shahed, Anna-Lena, Jonas, Eva-Lena, Julian et Yunus pour m'avoir donné l'opportunité de vous accompagner dans vos expérimentations, et pour les nombreux échanges scientifiques partagés.

Merci à l'école d'ingénieurs Purpan, tout d'abord pour la formation que j'y ai reçue et qui m'a guidée jusqu'à cette thèse, mais aussi pour m'avoir fait confiance en me permettant de réaliser plusieurs heures d'enseignements, un exercice passionnant et formateur. Merci en particulier à Charlotte, Vanille et Mathilde pour leur accompagnement dans cette expérience pédagogique.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à l'équipe ProbiHôte pour son accueil chaleureux, et pour ces neuf mois riches d'enseignements. Je remercie Philippe de m'avoir intégrée à son équipe avec bienveillance. Merci Rebeca pour ton accompagnement scientifique et humain, tu m'as transmis la passion pour le microbiote, et j'ai énormément appris à tes côtés. Merci Sead pour ta pédagogie, ta patience et tes nombreux conseils. Un immense merci à Lise, qui aurait cru que je gagnerais une jumelle au cours de cette thèse ? Ta présence à mes côtés a été précieuse, tant professionnellement que personnellement. Merci pour ton soutien, ton humour et tes encouragements constants. On aura partagé nos enthousiasmes et nos déceptions, mais on sera arrivé au bout de cette jolie aventure. Merci à Flo, Véro, Fred, Greg, Jean-Marc pour m'avoir transmis votre passion pour la microbiologie ... et les mots fléchés ! Merci à Célia, Luiz, Jade, Anne-Emm, Lorena et Loïc pour les moments conviviaux.

Je souhaite également remercier les membres de l'équipe MUSE pour leur engagement dans ce travail et les échanges toujours stimulants. Merci Laurent pour ton expertise en R, mes analyses de données et graphiques n'auraient pas eu la même clarté sans ton aide. Merci Géraldine pour ton investissement dans le projet, ta bonne humeur communicative et tes encouragements, tu auras réussi à nous faire sourire même dans les plus grands moments de doute. Corinne, merci pour ton aide précieuse et le temps que tu as consacré à ce travail lors des isollements, ton engagement a été déterminant. Je souhaite également adresser mes remerciements à Martin, pour son regard critique sur mes résultats et son aide dans l'approfondissement des analyses. Merci à Claudia pour son soutien dans les analyses microbiologiques. Merci Eloïse, pour ta présence en début de thèse et tous les conseils que tu as pu m'apporter par la suite. Une attention spéciale pour Lisa et Julie, les trois drôles de dames ! Merci pour votre présence en toute circonstance, pour les moments passés ensembles qui permettent toujours de mieux avancer par la suite, pour vos encouragements permanents et vos conseils sans faille. Enfin, je remercie tous ceux que j'ai croisés et qui ont, d'une manière ou d'une autre, contribué à la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier mes proches, amis et famille, de me soutenir et m'encourager au quotidien. Maman, Pauline, un simple merci ne saurait traduire toute la reconnaissance que je vous porte pour votre présence constante et votre appui inconditionnel. Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mon père, dont la lucidité et la bienveillance ont toujours su me guider avec justesse. Toi qui as souvent su avant moi ce qui me conviendrait le mieux, c'est en grande partie grâce à toi que j'ai trouvé ma voie. Une pensée pour mon grand-père, de qui je tiens la curiosité et le goût du travail, merci pour tout ce que tu m'as transmis.

## Publications et communications issues de la thèse

---

### Publications scientifiques dans des revues à comité de lecture de rang A

**Rumeau M.**, Fenaille F., Girard A., Loux V., Ba M., Nédellec C., Deléger L., Bossy R., Aubin S., Knudsen C. and Combes S. (2024). MilkOligoThesaurus, a dataset of mammalian milk oligosaccharides synonyms. Data in Brief 54, 110404. doi: 10.1016/j.dib.2024.110404

**Rumeau M.**, Chadi S., Pepke F., Beaumont M., Vicente C., Juppeau A., Vandecasteele C., Cauquil L., Pascal G., Langella P., Knudsen C., Combes S. and Martín R. Structure-dependent degradation of milk oligosaccharides by newly isolated intestinal commensal bacterial strains from suckling piglets and rabbits. BMC Microbiology <https://doi.org/10.1186/s12866-025-04205-y>

**Rumeau M.**, Courtin M., Bossy R., Sauvion C., Loux V., Ba M., Knudsen C., Combes S., Nédellec C. and Deléger L. MilkOligoCorpus: a semantically annotated resource for knowledge extraction on mammalian milk oligosaccharides. Plos One <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0319729>

Combes S., Cauquil L., **Rumeau M.**, Paës C., Pascal G, Vicente C., Beaumont M. and Knudsen C. (2025). Core gut microbiota in rabbit: opportunities to strengthen the intestinal barrier. Accepted dans World Rabbit Science (WRS).

Combes S., Knudsen C., **Rumeau M.**, Pascal G., Cauquil L., Helies V., Ruesche J., Poli M., Jones E., Lencina C., Castinel A., Averty E., Venot E., Cholet S., Beaumont M. and Fenaille F. The diversity of oligosaccharide composition in rabbit milk and its association with the development of the cecal microbiota and the survival of young rabbits. Article soumis à The Journal of Nutrition.

### Communications affichées et orales dans des congrès scientifiques

**Rumeau M.**, Knudsen C., Combes S. Structure diversity, functionality and modulation of milk oligosaccharides in monogastric livestock species towards optimal development of rabbit and pig holobionts. HOLOFLUX Symposium 2025, Paris, France. Présentation orale

**Rumeau M.**, Chadi S., Pepke F., Beaumont M., Cauquil L., Pascal G., Langella P., Knudsen C., Combes S. and Martín R. La structure des oligosaccharides du lait influence leur dégradation par les bactéries intestinales du lapin. Journée de la Recherche Cunicole (JRC) 2025, Rennes, France. Présentation orale

**Rumeau M.**, Chadi S., Pepke F., Beaumont M., Cauquil L., Pascal G., Langella P., Knudsen C., Combes S. and Martín R. La capacité des bactéries commensales du microbiote intestinal de lapin et de porc à métaboliser les oligosaccharides du lait en fonction de la structure de ces derniers. Séminaire du réseau HOLOA-AE : Holobionte des animaux d'élevage, 2025, Paris, France. Présentation orale

**Rumeau M.**, Chadi S., Pepke F., Beaumont M., Cauquil L., Pascal G., Langella P., Knudsen C., Combes S. and Martín R. Structure-dependent degradation of milk oligosaccharides by newly isolated intestinal commensal bacterial strains from suckling piglets and rabbits. Microbiome, Intestine and Brain Orchestra Scientific Meeting 2024, Toulouse, France. Présentation orale

**Rumeau M.**, Chadi S., Pepke F., Beaumont M., Cauquil L., Pascal G., Langella P., Knudsen C., Combes S. and Martín R. Structure-dependent degradation of milk oligosaccharides by newly isolated intestinal commensal bacterial strains from suckling piglets and rabbits. International Human Microbiome Consortium Congress (IHMC) 2024, Rome, Italie (HAL Id: hal-04666812).

**Rumeau M.**, Bossy R., Sauvion C., Loux V., Ba M., Knudsen C., Combes S., Nédellec C. and Deléger L. HoloOLIGO corpus, a manually annotated text dataset supporting schema-based relational information extraction for mammalian milk oligosaccharides diversity pattern comprehension. Journées ouvertes en Biologie, Informatique et Mathématiques (JOBIM) 2024, Toulouse, France (HAL Id: hal-04666797)

Combes S., Knudsen C., Beaumont M., **Rumeau M.**, Pascal G., Cauquil L., Helies V., Ruesche J., Poli M., Jones E., Lencina C., Annonay G., Venot A., Cholet S. and Fenaille F. Composition en oligosaccharides du lait de lapine et association avec la mise en place du microbiote caecal des lapereaux. Journée de la recherche cunicole (JRC) 2025, Rennes, France. Présentation orale

Combes S., Cauquil L., **Rumeau M.**, Paës C., Pascal G, Vicente C., Beaumont M. and Knudsen C. Core gut microbiota in rabbit: opportunities to strengthen the intestinal barrier. World Rabbit Congress (WRC) 2024, Taragone, Espagne. Présentation orale.

Bouamout H., Dérozier S., **Rumeau M.**, Deléger L., Courtin M., Nedellec C., Bossy R., Combes S., Loux V. and Ba M. HoloOLIGODB: Exploring Mammalian Milk Oligosaccharides. Journées ouvertes en Biologie, Informatique et Mathématiques (JOBIM) 2025, Bordeaux, France .  
Poster

## Contexte de réalisation de la thèse

---

La thèse présentée dans ce manuscrit a été réalisée au sein de l'équipe « Microbiote, nutrition et santé digestive » (MUSE) de l'Unité Mixte de Recherche « Génétique Physiologie et Systèmes d'Élevage » (UMR 1388 GenPhySE) dirigée par Juliette Riquet dans le centre INRAE Occitanie-Toulouse. L'équipe MUSE étudie le rôle des composés nutritionnels et non nutritionnels ingérés pendant la période postnatale dans la maturation des fonctions de la barrière intestinale, à savoir le microbiote, l'épithélium et les cellules immunitaires, ainsi que leurs interactions. L'objectif est de comprendre et optimiser le développement de la barrière intestinale dans un contexte de préservation de la santé des jeunes animaux d'élevage, particulièrement sensibles aux troubles digestifs.

Cette thèse s'est inscrite dans le cadre du projet HoloOLIGO (2022-2026), financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) et coordonné par Sylvie Combes (UMR GenPhySE). L'objectif du projet, regroupant sept partenaires scientifiques, est d'étudier les liens de causalité entre les structures des oligosaccharides du lait, le microbiote et le système immunitaire des jeunes. Dans ce cadre, la thèse a été menée en partenariat avec l'unité de recherche Mathématiques et Informatique Appliquées, du Génome à l'Environnement (MaIAGE), qui développe des méthodes mathématiques et informatiques motivées par des questionnements biologiques précis. De plus, 9 mois de la thèse ont été réalisés au sein d'INRAE Jouy-en-Josas, dans le cadre d'un partenariat avec l'équipe Interactions des Bactéries Commensales et Probiotiques avec l'Hôte (ProbiHôte) de l'institut MICrobiologie de l'ALimentation au Service de la Santé (MICALIS), qui dispose d'un atelier dédié à l'isolement et la caractérisation de souches bactériennes commensales.

La thèse a bénéficié d'un financement de l'ANR HoloOLIGO et du métaprogramme Holobiontes et flux microbiens au sein des systèmes agri-alimentaires (HoloFlux) qui s'intéresse à la constitution, à la dynamique et au pilotage des holobiontes en étudiant les interactions hôtes-microorganismes et les flux microbiens qui les traversent au sein de différents environnements. De plus, dans le cadre des expérimentations *in vitro*, la thèse a bénéficié d'un Material Transfer Agreement (MTA) avec l'entreprise de biotechnologie industrielle Inbiose, productrice d'oligosaccharides du lait.

La participation au parcours « Ecole internationale de recherche d'Agreenium » (EIR-A) m'a permis de réaliser un séjour de 3 mois dans l'équipe « AG Hornef » de l'institut de microbiologie médicale à l'hôpital universitaire RWTH d'Aachen (Allemagne). Ce séjour, encadré par le professeur Mathias Hornef, avait pour objectif d'optimiser le protocole d'isolement et de culture de cellules immunitaires intestinales de lapereaux, utilisé dans le cadre du troisième objectif de ma thèse.

# Table des matières

---

Remerciements .....	1
Publications et communications issues de la thèse .....	3
Contexte de réalisation de la thèse.....	5
Table des matières .....	6
Liste des tableaux.....	11
Liste des figures.....	12
Liste des abréviations.....	14
Introduction générale .....	17
Etude bibliographique.....	21
Chapitre 1 Diversité structurale des oligosaccharides du lait.....	23
I. Les oligosaccharides du lait.....	23
A. Des molécules découvertes récemment.....	23
B. Structure des oligosaccharides du lait .....	25
C. Classification des oligosaccharides du lait .....	29
D. Des structures dites déviantes .....	31
E. Une analyse quantitative et qualitative complexe .....	32
II. Mécanisme de biosynthèse des oligosaccharides du lait .....	33
A. Synthèse des oligosaccharides du lait dans la glande mammaire .....	33
B. Présence des oligosaccharides du lait dans d'autres fluides biologiques.....	36
III. Complexité structurale et nomenclature : absence de consensus autour de la nomenclature des oligosaccharides du lait.....	36
Chapitre 2 Patron de diversité des oligosaccharides du lait .....	40
I. Une variabilité inter-espèce .....	40
II. Une variabilité intra-espèces .....	44
A. La génétique .....	44
B. Race des animaux.....	47
C. Géographie .....	48
III. Une variabilité intra-individu .....	49
A. Stade de lactation.....	49
B. Rang de parité .....	50
C. Alimentation.....	51
Chapitre 3 Fonctions des oligosaccharides du lait .....	53
I. La muqueuse digestive, une barrière contre les agressions externes.....	53
A. Barrières physiques et chimiques .....	53

B.	Le GALT .....	55
1.	Les cellules de l'immunité .....	55
2.	Les structures de l'immunité .....	57
3.	La réponse immunitaire.....	59
C.	Le microbiote intestinal.....	60
1.	L'intestin, un environnement riche en microorganismes .....	61
2.	Le rôle du microbiote dans la protection de la muqueuse .....	61
i.	Exclusion compétitive des pathogènes .....	61
ii.	Effets directs du microbiote sur la barrière intestinale.....	62
iii.	Effets indirects via des métabolites bactériens.....	63
D.	Les mécanismes de développement de la barrière intestinale .....	64
1.	Maturation immunitaire de l'hôte .....	64
2.	Développement du microbiote de l'hôte .....	68
3.	Interaction microbiote-immunité.....	69
II.	Rôle des oligosaccharides du lait sur la santé.....	70
A.	Devenir des oligosaccharides du lait après ingestion chez le nouveau-né.....	70
B.	Les oligosaccharides du lait favorisent la croissance de certaines bactéries commensales.....	71
1.	Les <i>Bifidobacterium</i> , principaux modèles d'études de l'effet prébiotique des oligosaccharides du lait .....	71
2.	Les <i>Bacteroides</i> , des bactéries capables de dégrader les oligosaccharides du lait	73
3.	Phénomène de syntrophie chez les espèces incapables de dégrader les oligosaccharides du lait .....	74
C.	Effets antimicrobiens .....	82
D.	Renforcement de la barrière épithéliale.....	83
1.	Action sur la prolifération et la différenciation des cellules .....	83
2.	Impact fonctionnel sur la perméabilité .....	84
3.	Impact fonctionnel sur la production de mucus .....	84
4.	Impact fonctionnel sur la réponse immunitaire.....	85
E.	Action directe sur la réponse immunitaire .....	85
1.	Liaisons des oligosaccharides du lait aux cellules immunitaires .....	85
2.	Propriétés anti inflammatoires des oligosaccharides du lait .....	87
3.	Maturation des cellules immunitaires et développement de la tolérance par l'équilibre de la balance Th1/Th2.....	88

F.	Action indirecte sur la réponse immunitaire via la production de métabolites bactériens.....	89
1.	Les métabolites produits par la dégradation bactérienne .....	89
2.	Les effets des métabolites sur l'épithélium.....	90
3.	Les effets des métabolites sur la réponse immunitaire .....	91
Chapitre 4	Utilisation des oligosaccharides du lait pour promouvoir la santé.....	93
I.	Le sevrage, une période de sensibilité accrue en élevage.....	93
A.	Le sevrage en élevages porcins et cunicoles, une période de troubles digestifs	93
1.	Un sevrage précoce en élevage.....	93
2.	Des causes multifactorielles aux troubles digestifs.....	94
B.	Fenêtre d'opportunité pour optimiser la maturation de la barrière intestinale	96
C.	Stratégies alternatives à l'antibiothérapie pour préserver la santé du jeune animal en élevage.....	97
II.	Potentiels d'utilisation des oligosaccharides du lait pour piloter la santé en amont du sevrage .....	99
A.	Disponibilité des oligosaccharides du lait .....	99
B.	Bénéfices d'une supplémentation avec des oligosaccharides du lait.....	99
III.	Outils pour l'étude de la relation structure fonction des oligosaccharides du lait	100
A.	Outils pour l'étude des mécanismes d'action de composés alimentaires sur les bactéries du microbiote .....	101
1.	La culture de bactéries, un outil clé pour les études fonctionnelles .....	101
2.	L'isolement de bactéries à partir des individus cibles.....	102
3.	Phénotypage des espèces bactériennes .....	102
B.	Outils pour l'étude des mécanismes d'action de composés alimentaires sur la réponse immunitaire.....	103
1.	Différences entre lignées cellulaires et cultures primaires.....	103
2.	Importance de l'origine des cellules isolées.....	104
3.	Intérêt de la stimulation des cellules immunitaires en culture.....	105
C.	Etude d'un mélange d'oligosaccharides du lait ou d'oligosaccharides du lait individuels .....	106
1.	Le choix des oligosaccharides du lait étudiés.....	106
2.	La dose des oligosaccharides du lait.....	107
Problématique et objectifs de recherche	.....	109
Etudes expérimentales.....		113

Chapitre 1 Des outils pour évaluer la diversité des oligosaccharides du lait en lien avec les métadonnées de la femelle.....	115
Chapitre 2 Analyse de la capacité des bactéries commensales intestinales de porcelets et lapereaux à dégrader les oligosaccharides du lait selon leur structure .....	164
Chapitre 3 Analyse des effets directs et indirects des oligosaccharides du lait sur la réponse immunitaire intestinale du lapereau.....	213
Discussion générale et perspectives .....	281
I.    Justification de nos stratégies expérimentales et méthodologiques .....	283
A.    Stratégie expérimentale générale.....	283
B.    Evaluation des effets des MOs sur le microbiote .....	285
1.    Intérêt de l’approche culture-dépendante pour les études fonctionnelles	285
2.    Conditions de culture bactérienne en présence des MOs .....	286
C.    Evaluation des effets des MOs sur la réponse immunitaire intestinale .....	287
1.    L’utilisation de LPMCs.....	287
2.    La complexité d’obtention de LPMCs.....	287
3.    Le choix des modalités d’expérimentation .....	288
II.    L’exploitation des données de la littérature : un enjeu méthodologique face à la complexité des oligosaccharides du lait.....	289
A.    Comprendre la diversité des MOs : une nécessité biologique .....	289
1.    Une biodiversité encore sous-explorée.....	289
2.    Comprendre les facteurs de variation .....	290
B.    L’homogénéisation des dénominations : vers un langage commun .....	290
C.    La nécessité d’une annotation guidée et contextualisée .....	291
III.    Effets des oligosaccharides du lait sur les bactéries commensales nouvellement isolées.....	292
A.    Isolement des bactéries .....	292
1.    Stratégies d’isolement bactérien : choix des milieux et ajustements méthodologiques .....	292
2.    Représentativité des isolats par rapport au microbiote de nos animaux modèles .....	293
B.    Culture en présence de MOs.....	295
1.    Choix des souches évaluées en présence de MOs .....	295
2.    Une croissance qui dépend de la structure des oligosaccharides du lait ....	295
3.    Mécanisme d’interaction avec les MOs .....	296
i.    Différence d’affiliations bactériennes .....	296
ii.    Identification des enzymes impliquées dans la dégradation des MOs .....	296

4.	Produits de dégradation des MOs.....	297
i.	Monosaccharides libérés par l'hydrolyse des MOs.....	297
ii.	Produits de la métabolisation des MOs .....	298
IV.	Effets des oligosaccharides du lait sur l'immunité.....	299
A.	Développement d'outils pour l'étude de la réponse immunitaire mucoale..	299
B.	Les oligosaccharides du lait exercent un faible effet direct sur la réponse immunitaire.....	300
1.	Effets limités des oligosaccharides du lait sur l'expression génique immunitaire de la muqueuse intestinale .....	300
2.	Hypothèses méthodologiques expliquant les divergences avec la littérature	300
V.	Impact des oligosaccharides du lait sur la mise en place de l'holobionte.....	302
A.	Les oligosaccharides du lait comme modulateurs précoces du microbiote intestinal.....	302
1.	Les oligosaccharides du lait structurent l'holobionte intestinal .....	302
2.	Sélection de souches bactériennes via les produits de dégradation des oligosaccharides du lait .....	303
i.	Monosaccharides libérés par l'hydrolyse des MOs.....	303
ii.	Produits de la métabolisation des MOs .....	304
B.	Une action conjointe MOs-microbiote-système immunitaire dans la mise en place de l'holobionte.....	305
1.	Potentielle action des monosaccharides libérés par hydrolyse des oligosaccharides du lait .....	305
2.	Les produits issus de la métabolisation des oligosaccharides du lait .....	305
i.	Effets immunomodulateurs indirects des oligosaccharides du lait via les métabolites bactériens.....	305
ii.	Portée physiologique des effets observés chez le lapereau .....	306
VI.	Perspectives .....	307
A.	Caractérisation approfondie de nos modèles.....	308
B.	Modèle <i>in vitro</i> intégrant le microbiote, l'épithélium et le système immunitaire	308
C.	Essais <i>in vivo</i> .....	309
	Conclusion générale .....	311
	Références bibliographiques.....	315

## Liste des tableaux

---

Tableau 1 : Composition nutritionnelle du lait de plusieurs espèces mammifères. ....	23
Tableau 2 : Représentation des sept monosaccharides entrant dans la structure des oligosaccharides du lait avec leurs nomenclatures visuelles respectives.....	27
Tableau 3 : Liaisons glycosidiques entrant dans la composition des oligosaccharides du lait	29
Tableau 4 : Liste des treize noyaux des oligosaccharides du lait. ....	30
Tableau 5 : Nomenclature visuelle des monosaccharides .....	39
Tableau 6 : Composition du lait porcin en oligosaccharides du lait .....	43
Tableau 7 : Capacité des souches bactériennes à dégrader les oligosaccharides du lait.....	76
Tableau 8 : Appréciation du niveau d'exposition aux antibiotiques.....	98
Tableau 9 : Bilan des effets des oligosaccharides du lait sur le microbiote intestinal de nos espèces modèles .....	299

## Liste des figures

---

Figure 1 : Cyclisation d'une molécule de glucose, monosaccharide à six carbones. ....	26
Figure 2 : Formation du disaccharide maltose par liaison glycosidique entre deux molécules de glucose.....	26
Figure 3 : Structure des oligosaccharides du lait représentée avec la nomenclature SNFG. ..	28
Figure 4 : Structures des oligosaccharides du lait similaires aux glycosphingolipides identifiés chez certains mammifères non humains. ....	32
Figure 5 : Synthèse du lactose dans les cellules épithéliales de la glande mammaire. ....	34
Figure 6 : Biosynthèse des treize noyaux d'oligosaccharides du lait.....	35
Figure 7 : Structure du difucosyl-para-lacto-N-hexaose II (DF-para-LNH II) .....	37
Figure 8 : Différences de composition des oligosaccharides du lait entre les laits humains, bovins, porcins, ovins et caprins. ....	41
Figure 9 : Lactotypes basés sur les gènes sécréteur (Se ou FUT2) et Lewis (Le ou FUT3). ....	46
Figure 10 : Motifs Lewis x et Lewis y basés sur l'expression des enzymes FUT2 et FUT3 sur des MOs de type II. ....	46
Figure 11 : Pourcentage de chaque type d'oligosaccharide du lait selon le lactotype de la mère. ....	47
Figure 12 : Proportion des phénotypes Sécréteurs / non Sécréteurs selon la géographie. ....	48
Figure 13 : Barrières physiques et chimiques de la muqueuse intestinale du colon.....	55
Figure 14 : Tractus digestif du lapin et du porc.....	58
Figure 15 : Représentation schématique du tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (GALT).....	60
Figure 16 : Cinétique d'évolution de la composition en cellules immunitaires dans l'intestin grêle murin au cours des 56 premiers jours de vie.....	65
Figure 17 : Concentration en (A) IgG, IgA et IgM dans le colostrum et le lait de truie (B) IgA dans le contenu caecal et IgG dans le plasma de lapereaux en fonction de l'âge et du régime alimentaire. ....	66
Figure 18 : Proportion des (A) (D) (G) lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> , (B) (E) (H) lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> et (C) (F) (I) lymphocytes B au cours du temps dans différents compartiments chez le porcelet. ....	67
Figure 19 : Proportion des lymphocytes totaux (pT), lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> , lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> , lymphocytes B (CD79 <sup>+</sup> ) et lymphocytes T immatures double positifs (CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ) chez le lapin. ....	67
Figure 20 : Enzymes catalysant l'hydrolyse des liaisons des oligosaccharides du lait.....	72
Figure 21 : Mécanisme d'utilisation des oligosaccharides du lait par les Bifidobacterium.....	73
Figure 22 : Représentation schématique de la liaison des MOs aux lectines des cellules immunitaires. ....	87
Figure 23 : Mécanismes d'action des acides gras à chaînes courtes (AGCCs) sur les cellules épithéliales et immunitaires de l'intestin. ....	91
Figure 24 : Rôle des oligosaccharides du lait sur la santé.....	92
Figure 25 : Conséquences du sevrage sur la physiologie intestinale.....	96

Figure 26 : Comparaison des cellules mononuclées du sang périphérique et du côlon recto-sigmoïde .....	104
Figure 27 : Stratégie expérimentale pour répondre à l'objectif de thèse. ....	112
Figure 28 : Stratégie expérimentale pour répondre à l'objectif de thèse.. ....	284
Figure 29 : Glycosides hydrolases (GHs) présentes dans le génome des souches capables de dégrader les MOs. ....	298
Figure 30 : Effets des oligosaccharides du lait LNT, 2'-FL, 6'SL et 3'-SL sur l'immunité intestinale de notre modèle lapin. ....	301
Figure 31 : Effets des oligosaccharides du lait LNT, 2'-FL, 6'SL et 3'-SL sur l'holobionte de nos modèles porcs et lapins.....	307

## Liste des abréviations

<b>2'-FL</b> : 2'-fucosyllactose	<b>DF-<i>para</i>-LNH</b> :	Difucosyl- <i>para</i> -lacto-N-hexaose
<b>3-FL</b> : 3-fucosyllactose	<b>DF-<i>para</i>-LNH II</b> :	Difucosyl- <i>para</i> -lacto-N-hexaose II
<b>3'-GL</b> : 3'-galactosyllactose	<b>DSLNH</b> :	Disialyllacto-N-hexaose
<b>3'-NGL</b> : 3'-N-glycolylneuraminyllactose	<b>DSLNT</b> :	Disialyllacto-N-tetraose
<b>3'-SL</b> : 3'-sialyllactose	<b>EGF</b> :	Epidermal growth factors
<b>6'-GL</b> : 6'-galactosyllactose	<b>EHEC</b> :	<i>Escherichia coli</i> entérohémorragique
<b>6'-SL</b> : 6'-sialyllactose	<b>EIR-A</b> :	Ecole internationale de recherche d'Agreenium
<b>ABC</b> : ATP-Binding Cassette	<b>ERE</b> :	Epizootic Rabbit Enteropathy
<b>ADN</b> : Acide désoxyribonucléique	<b>ETEC</b> :	<i>Escherichia coli</i> entérotoxigéniques
<b>ADNr 16S</b> : Acide désoxyribonucléique ribosomique 16S	<b>FAE</b> :	Follicle-associated epithelium
<b>AGCC</b> : Acide gras à chaîne courte	<b>FcRn</b> :	Neonatal fragment crystallizable receptor
<b>ALEA</b> : Assesment of the Level of Exposure to Antibiotics	<b>FLNH</b> :	Fucosyl-lacto-N-hexaose
<b>ANR</b> : Agence Nationale de la Recherche	<b>FOS</b> :	Fructooligosaccharides
<b>ANSES</b> : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail	<b>Fuc</b> :	Fucose
<b><math>\beta</math>3GalT</b> : $\beta$ 3-Galactosyltransférase	<b>FUT</b> :	Fucosyltransférase
<b><math>\beta</math>3GlcNAcT</b> : Enzyme $\beta$ 1-3-N-acétylglucosaminyltransférase	<b>Gal</b> :	Galactose
<b><math>\beta</math>4GalT</b> : $\beta$ 4-Galactosyltransférase	<b>GALE</b> :	Enzyme galactose épimérase
<b><math>\beta</math>6GlcNAcT</b> : Enzyme $\beta$ 1-6-N-acétylglucosaminyltransférase	<b>GalNAc</b> :	N-acétylgalactosamine
<b>BCFA</b> : Branched chain fatty acid	<b>GALT</b> :	Gut associated lymphoid tissue
<b>BCR</b> : B-cell receptor	<b>GAPDH</b> :	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<b>CD</b> : Cluster de différenciation	<b>GDP-Fuc</b> :	Guanosine diphosphate fucose
<b>CMH</b> : Complexe majeur d'histocompatibilité	<b>GenPhySE</b> :	Génétique Physiologie et Systèmes d'Élevage
<b>CMP-NeuAc</b> : Cytidine monophosphate N-acétylneuraminique	<b>GH</b> :	Glycoside hydrolase
<b>CMP-NeuGc</b> : Cytidine monophosphate N-glycolylneuraminique	<b>Glc</b> :	Glucose
<b>ConA</b> : Concanavaleine A	<b>GlcNAc</b> :	N-acétylglucosamine
<b>CPA</b> : Cellules présentatrices d'antigènes	<b>GLUT1</b> :	Transporteur de glucose 1
<b>CpG</b> : Cytosine-phosphate-guanine	<b>GOS</b> :	Galactooligosaccharides
<b>DC-SIGN</b> : Dendritic cell-specific ICAM3 <sup>+</sup> -grabbing non integrin	<b>GPR</b> :	Récepteur couplé aux protéines G
<b>DFL</b> : Difucosyllactose	<b>HDAC</b> :	Histone désacétylase
<b>DFLNH I</b> : Difucosyl-lacto-N-hexaose I	<b>HK</b> :	Hexokinases
	<b>Holoflux</b> :	Holobiontes et flux microbiens au sein des systèmes agri-alimentaires

**HPAEC** : Chromatographie d'échange d'ions à pH élevé avec détection ampérométrique  
**HPLC** : Chromatographie à interaction hydrophile  
**IFN- $\gamma$**  : Interferon gamma  
**Ig** : Immunoglobuline  
**IL** : Interleukine  
**ILC** : Innate lymphoid cell  
**iLNO** : *Iso*-lacto-N-octaose  
**IUPAC** : International Union of Pure and Applied Chemistry  
**Lac** : Lactose  
**Le** : Lewis  
**LDFT** : Lactodifructotetraose  
**LND** : Lacto-N-decaose  
**LNDFH I** : Lacto-N-difucohexaose I  
**LNFP** : Lacto-N-fucopentaose  
**LNH** : Lacto-N-hexaose  
**LNd** : Lacto-N-*neo*-decaose  
**LNdH** : lacto-N-*neo*-hexaose  
**LNdO** : Lacto-N-*neo*-octaose  
**LNdT** : Lacto-N-*neo*-tetraose  
**LNO** : Lacto-N-octaose  
**LNT** : Lacto-N-tetraose  
**LPMCs** : *Lamina propria* mononuclear cells  
**LPS** : Lipopolysaccharide  
**LST** : Sialyllacto-N-tetraose  
**MaIAGE** : Mathématiques et Informatique Appliquées, du Génome à l'Environnement  
**MICALIS** : MICrobiologie de l'ALImentation au Service de la Santé  
**MO** : Milk Oligosaccharide  
**MTA** : Material Transfer Agreement  
**MUSE** : Microbiote, nUtrition et Santé digestivE  
**NCBI** : National Center for Biotechnology Information  
**NK** : Natural killer  
**NEC** : Necrotizing enterocolitis  
**NeuAc** : Acide N-acétylneuraminique  
**NeuGc** : Acide N-glycolylneuraminique  
**NLR** : Nod like receptor

**NOD2** : Nucleotide-binding oligomerization domain  
**OGM** : Organisme génétiquement modifié  
**OMS** : Organisation mondiale de la santé  
**PAMP** : Pathogen associated molecular pattern  
**PBMC** : Peripheral blood mononuclear cells  
**PGM1** : phosphoglucomutase  
**PGlyRP3** : Peptidoglycan recognition protein 3  
**PHA** : Phytohémagglutinine  
**pLNH** : *Para*-lacto-N-hexaose  
**pLNnH** : *Para*-lacto-N-*neo*-hexaose  
**pLNO** : *Para*-lacto-N-octaose  
**PMA** : Phorbol 12-myristate 13-acetate  
**PWM** : Pokeweed mitogen  
**ProbiHôte** : Interactions des Bactéries Commensales et Probiotiques avec l'Hôte  
**PRR** : Pattern recognition receptor  
**PUL** : Polysaccharide utilization loci  
**RP HPLC** : Chromatographie en phase inversée  
**Se** : Sécréteur  
**sIgA** : Immunoglobuline A sécrétoire  
**Siglec** : Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin  
**SLC35A2** : Translocateur UDP-galactose  
**S-LNdH II** : Sialyllacto-N-*neo*hexaose II  
**SNFG** : Symbol Nomenclature for Glycans  
**TCR** : T-cell receptor  
**TEER** : Transepithelial electrical resistance  
**Tfh** : T auxiliaire folliculaire  
**TGF- $\beta$**  : Transforming growth factor- $\beta$   
**TNF** : Tumor necrosis factor  
**Th** : Lymphocytes T helper  
**TLR** : Toll like receptor  
**UDP** : Uridine diphosphate  
**UDP-Gal** : Uridine-diphosphate galactose  
**UDP-Glc** : Uridine-diphosphate glucose  
**UGP2** : UDP-glucose-pyrophosphorylase



# Introduction générale



En élevages porcins et cunicoles, la santé digestive des jeunes animaux constitue un enjeu majeur, en particulier autour de la période critique du sevrage. Ce moment clé du développement, marqué par une transition nutritionnelle, sociale et environnementale, perturbe profondément l'équilibre intestinal et s'accompagne fréquemment de troubles digestifs (Licois and Marlier, 2008; Gresse et al., 2017). Ces troubles traduisent une vulnérabilité accrue liée au développement incomplet de la barrière intestinale, structure complexe composée du microbiote, de l'épithélium et du système immunitaire intestinal. Pour limiter l'incidence des morbidités et mortalités à cette période, et des pertes économiques associées, des intrants médicamenteux sont encore largement utilisés. Bien qu'entre 2011 et 2020, l'exposition des porcs et lapins aux antibiotiques ait diminué de 56 % et 40 % respectivement (Paul et al., 2022), ces espèces demeurent les plus exposées aux antibiotiques devant les volailles et les bovins (Anses, 2024). Or l'usage important d'antibiotiques est aujourd'hui contesté, en raison de ses conséquences sur l'émergence des résistances aux antibiotiques (Morehead and Scarbrough, 2018). Ce constat a conduit les filières d'élevage à repenser leurs pratiques et à engager une réduction massive de l'utilisation des antibiotiques (Paul et al., 2022). Cette évolution des pratiques nécessite d'identifier et de valider des alternatives permettant de préserver la santé digestive des jeunes animaux.

Parmi les approches les plus prometteuses, la modulation du microbiote intestinal se distingue comme un levier central. Le microbiote joue un rôle déterminant dans le développement de l'immunité et le maintien de l'homéostasie intestinale (Pabst and Rothkötter, 1999; Rhee et al., 2004). La colonisation microbienne précoce participe à l'éducation du système immunitaire, à la maturation de la barrière épithéliale intestinale et à la protection contre les agents pathogènes. Agir en amont du sevrage, via des interventions ciblées, représente ainsi une stratégie pertinente pour limiter l'apparition des troubles digestifs.

Les oligosaccharides du lait, constituent des candidats de choix dans cette perspective. Non digestibles par les enzymes de l'hôte, les oligosaccharides du lait atteignent les segments distaux du tube digestif (Brand-Miller et al., 1998), caecum et côlon, où ils servent de substrats sélectifs à certaines bactéries commensales, notamment les genres *Bifidobacterium* et *Bacteroides* (Marcobal et al., 2010; Yu et al., 2013; Salli et al., 2021). En modulant la composition et l'activité métabolique du microbiote, ils influencent indirectement l'immunité, via la production de métabolites tels que les acides gras à chaînes courtes (Šuligoj et al., 2020). De plus, plusieurs travaux suggèrent que certains oligosaccharides du lait interagiraient directement avec les cellules immunitaires intestinales, influençant ainsi la réponse immunitaire locale (Triantis et al., 2018).

Présents dans le lait de tous les mammifères, les profils de composition en oligosaccharides du lait sont cependant très variables selon les espèces, mais aussi selon des facteurs tels que la génétique, le stade de lactation ou les conditions environnementales (Durham et al., 2023). Cette diversité structurale interroge sur la spécificité fonctionnelle des oligosaccharides du lait. En effet, plusieurs études montrent que des structures différentes induisent des effets

biologiques distincts sur les bactéries ou l'hôte (LoCascio et al., 2009; Marcobal et al., 2011; Boll et al., 2024).

Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que la modulation du microbiote et de l'immunité par les oligosaccharides du lait pourrait favoriser un développement optimal de la barrière intestinale chez les porcelets et les lapereaux, mais que ces effets dépendent fortement de leur structure. L'objectif de cette thèse était ainsi de comprendre comment la diversité structurale des oligosaccharides du lait influence leurs effets sur les bactéries intestinales commensales et sur les cellules immunitaires intestinales.

Le manuscrit s'ouvre sur une revue de la littérature visant à établir l'état actuel des connaissances relatives aux oligosaccharides du lait. Cette synthèse abordera successivement (i) la diversité structurale des oligosaccharides du lait, (ii) les facteurs influençant les patrons de diversité des oligosaccharides du lait observés, (iii) les fonctions des oligosaccharides du lait dans la maturation de la barrière intestinale ainsi que (iv) les applications potentielles des oligosaccharides du lait pour promouvoir la santé digestive et les modèles d'étude *in vitro* disponibles. Après avoir explicité la problématique de ce travail et les stratégies expérimentales mises en œuvre, les résultats seront exposés sous la forme de cinq articles scientifiques. Enfin, une discussion générale proposera une analyse critique des résultats au regard de la bibliographie, en vue de répondre à la problématique posée et d'émettre des perspectives à ce travail de thèse.

# Etude bibliographique



# Chapitre 1 Diversité structurale des oligosaccharides du lait

## I. Les oligosaccharides du lait

### A. Des molécules découvertes récemment

Entre leur naissance et la période où ils atteignent la capacité de consommer des aliments solides, le lait est le premier et unique aliment des nouveau-nés mammifères, classe d'animaux vertébrés caractérisés par la présence d'une glande mammaire et la capacité des femelles reproductrices à sécréter du lait (Tizard, 2023). Le lait doit donc couvrir les besoins nutritionnels et physiologiques du nouveau-né, dont les systèmes digestifs et immunitaires sont encore immatures.

Les principaux composants du lait, communs à tous les mammifères et responsables des fonctions nutritionnelles, sont les protéines, les lipides, le lactose et les minéraux. Cependant, la similarité entre espèces se limite à l'aspect qualitatif puisque la répartition quantitative de ces composants nutritionnels diffère selon les espèces (Tableau 1). Plusieurs facteurs expliquent les différences de composition (Fox et al., 2015). Le stade de développement à la naissance, qui dépend de la durée de gestation, avec un lait moins riche en matière sèche (matière grasse, lactose, matières azotées et matières salines) pour les espèces plus matures à la naissance tels que les ongulés, mammifères pourvus de sabots (Shad, 1963). Les mammifères de faible masse corporelle ne pouvant ingérer qu'une faible quantité de lait à la fois, ce dernier présente une densité nutritive plus importante pour garantir la couverture de l'ensemble des besoins nutritifs et métaboliques dans cette quantité ingérée réduite (Blaxter, 1961). Enfin, en fonction de la stratégie d'allaitement, la composition du lait sera différente. Plus la durée de lactation est longue plus le lait sera pauvre en matière sèche, afin de garantir la longévité de la production laitière (Skibiél et al., 2013). En termes de fréquence d'allaitement, les espèces qui n'allaitent qu'une fois par jour, comme le lapin, possèdent un lait très concentré, à l'inverse des chevaux, qui allaitent toutes les demi-heures, dont le lait est très pauvre en matière sèche (Iverson, 2007).

Tableau 1 : Composition nutritionnelle du lait de plusieurs espèces mammifères. Les quantités sont indiquées en pourcentage de la composition totale du lait brut (Jenness, 1974).

	Humain	Vache	Porc	Lapin
<b>Lipides</b>	3.8	3.7	6.8	18.3
<b>Protéines</b>	1	3.4	4.8	13.9
<b>Lactose</b>	7	4.8	5.5	2.1

Outre ses composés nutritionnels, le lait contient également des composés bioactifs non nutritionnels. Un composé bioactif affecte les processus biologiques de façon bénéfique, résultant en des effets physiologiques mesurables (Bhat and Bhat, 2011). Les principaux

composés bioactifs du lait sont les immunoglobulines, les enzymes, les peptides antimicrobiens, les hormones, les cytokines, et les facteurs de croissance. Ces composés bioactifs seraient destinés à compenser l'immaturation du système immunitaire à la naissance en agissant notamment sur son développement et sur la protection contre les agents pathogènes (Fox et al., 2015).

Parmi ces composés bioactifs du lait on trouve également les oligosaccharides du lait (MOs, pour Milk Oligosaccharides), dont le rôle fait l'objet de nombreuses études aujourd'hui. Kunz et Egge (2017), dans l'ouvrage *Prebiotics and Probiotics in Human Milk*, ont détaillé l'historique de la découverte des oligosaccharides du lait. Selon ces auteurs, leur découverte remonte à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, période au cours de laquelle le taux de mortalité des enfants recevant du lait industriel était sept fois supérieur à celui des enfants allaités, ces derniers présentant une résistance plus forte aux diarrhées infectieuses que ceux nourris au lait bovin. Un lien entre les bactéries intestinales et la physiologie de la digestion venait tout juste d'être établi en 1886 par le pédiatre et microbiologiste autrichien Theodor Escherich. Suite à ce constat, le médecin pédiatre Ernst Moro décide, en 1890, de comparer le microbiote intestinal des enfants allaités à celui des enfants nourris au lait de vache, mettant en avant la prédominance de *Lactobacillus bifidus*, désormais connue sous le nom de *Bifidobacterium bifidum*, dans les fèces des enfants allaités. Ernst Moro a ensuite concentré ses recherches sur la découverte du facteur bifidus, fraction du lait à l'origine de la croissance de cette bactérie. Parallèlement, en 1888, le chimiste Eschbach découvre une fraction carbohydrate encore inconnue dans le lait humain et absente du lait bovin (Oliveira et al., 2015). Par la suite, les études ont donc été menées conjointement par des chimistes, soucieux de caractériser les glucides présents uniquement dans le lait humain, et des pédiatres et microbiologistes, souhaitant comprendre l'origine des propriétés bénéfiques du lait humain.

Ce n'est que 40 ans plus tard, autour de 1930, que Michel Polonowski et Albert Lespagnol décrivent pour la première fois la fraction glucidique du lait humain, alors dénommée gynolactose, une fraction hétérogène contenant de l'azote comme composé essentiel. En 1954, le chimiste Jean Montreuil met au point la méthode de chromatographie sur papier en deux dimensions. Cette dernière a permis la première caractérisation d'oligosaccharides du lait sous forme de molécules individuelles, les deux isomères du fucosyllactose (2'-fucosyllactose et 3-fucosyllactose) (Montreuil, 1957).

La collaboration entre le chimiste Richard Kuhn et le médecin pédiatre Paul György dans les années 1950 a permis de combiner la description structurale des oligosaccharides du lait avec des études fonctionnelles (György et al., 1954). Les deux chercheurs ont ainsi découvert que le facteur de croissance de *Lactobacillus bifidus* contenait le monosaccharide N-acétylglucosamine et des polysaccharides. Ce rôle de « facteur bifidus » du lait humain a alors été comparé avec le lait et le colostrum d'autres espèces mammifères, le rat, le chat, l'âne, le chien, le singe, le porc, le bovin, la brebis et la chèvre. L'utilisation de ces laits en tant que

milieu de culture des bactéries a démontré que le colostrum humain permettait la plus grande capacité de croissance, tandis que la plus faible était celle obtenue avec le lait des ruminants. Les chercheurs mettaient alors en avant la capacité de *Lactobacillus bifidus* à dégrader des substances contenant le monosaccharide N-acétylglucosamine, plus tard connus sous le nom de MOs. György et Kuhn en ont conclu que cette consommation permet de lutter contre l'invasion du tractus digestif par des pathogènes via la croissance de *Lactobacillus bifidus* qui consomme les nutriments alors rendus indisponibles, produit de l'acide acétique et de l'acide lactique (ratio 3 :2) et diminue le pH intestinal (Kunz and Egge, 2017).

Après les premières élucidations de structures en 1950, de nombreuses recherches, auxquelles ont notamment contribué Kobata, Ginsburg et Tsuda (1969), ont permis de caractériser davantage d'oligosaccharides du lait. En 1965, la structure de 14 oligosaccharides du lait avait ainsi été déterminée par les équipes de recherche de Kuhn et Montreuil. Les évolutions des techniques d'identification et de caractérisation des MOs ces 60 dernières années ont grandement contribué à la connaissance de ces molécules (Kobata, 2010).

#### B. Structure des oligosaccharides du lait

Les polysaccharides, ou carbohydrates en anglais, également dénommés glycanes ou glucides complexes, sont un assemblage de glucides simples, les monosaccharides. Ces derniers sont composés d'un enchainement d'unités de groupe hydroxyméthyle ( $-\text{CH}_2\text{-OH}$ ) et d'un groupe carbonyle ( $\text{C}=\text{O}$ ) présent à l'extrémité de la molécule pour les groupes aldéhydes ou entre deux groupes hydroxyles pour les groupes cétones (Berg et al., 2015). Communément, les monosaccharides prennent une forme cyclique par liaison entre le groupe aldose (carbone 1) ou cétone (carbone 2) et l'un des groupes hydroxyméthyles. L'état d'hybridation du carbone du groupe aldose ou cétone est alors modifié et donne lieu à un carbone asymétrique, dénommé carbone anomérique, lié à quatre groupes d'atomes différents (Figure 1) (Nelson et al., 2021). Dans les monosaccharides du groupe aldose, la réaction entre le groupe aldose et le groupe hydroxyméthyle forme une fonction hémiacétalique ( $\text{R-CH(OH)-OR}'$ ). Lorsque cette dernière est libre, le sucre possède un pouvoir réducteur, le carbone du groupe hémiacétal pouvant être oxydé en raison de la présence d'un groupe fonctionnel aldéhyde libre (Nelson et al., 2021).

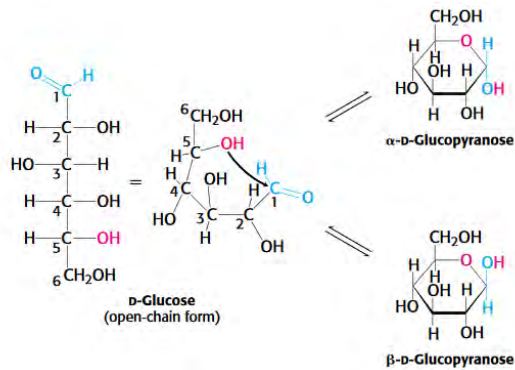


Figure 1 : Cyclisation d'une molécule de glucose, monosaccharide à six carbones. Le groupe hydroxyle (-OH) du carbone 5 se lie à l'atome d'oxygène du groupe aldéhyde (C=O) du carbone 1 dans la chaîne ouverte. Cette liaison donne lieu à la forme cyclique de la molécule avec un carbone anomérique (carbone 1). On distingue la forme  $\alpha$  lorsque le groupe hydroxyle se trouve du côté opposé au groupe hydroxyméthyle terminal et la forme  $\beta$  lorsque les deux groupes sont du même côté. D'après Berg et al. (2015).

Selon l'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (2006), les oligosaccharides sont des composés contenant trois à neuf résidus de sucres monomères (monosaccharides), le nombre de ces résidus déterminant le degré de polymérisation. Les monosaccharides sont liés entre eux par des liaisons glycosidiques, formées entre le carbone anomérique d'un monosaccharide et l'un des groupes hydroxyles d'un autre monosaccharide (Figure 2). Selon la configuration spatiale du carbone anomérique engagé, les liaisons peuvent être de type  $\alpha$  ou  $\beta$ . La partie de l'oligosaccharide où se trouve le monosaccharide dont le groupe hémiacétal n'est pas engagé dans une liaison est appelée extrémité réductrice. La terminaison opposée de la molécule est quant à elle dénommée extrémité non réductrice puisque le groupe hémiacétal est engagé dans une liaison. Par convention, les structures sont nommées à partir de leur extrémité non réductrice (Varki and Kornfeld, 2022).

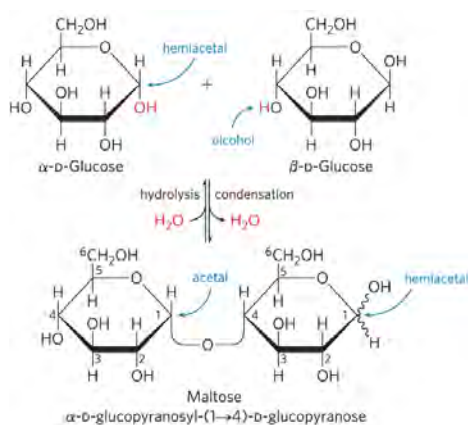


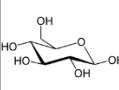
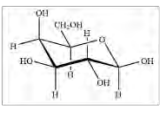
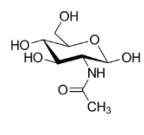
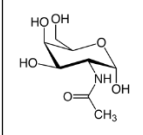
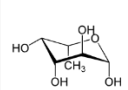
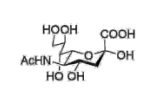
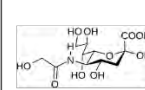
Figure 2 : Formation du disaccharide maltose par liaison glycosidique entre deux molécules de glucose. Le groupe hydroxyle d'un glucose condense avec le groupe hémiacétal de l'autre monosaccharide formant une liaison glycosidique avec production d' $H_2O$ . D'après Nelson et al. (2021).

Le lait des mammifères est composé de plusieurs types d'oligosaccharides, les oligosaccharides glycoconjugués et les oligosaccharides libres. Les glycoconjugués sont des

structures dans lesquelles au moins un monosaccharide est lié à une molécule non glucidique telles que les protéines ou lipides. Le lait des mammifères contient des glycoprotéines, glycopeptides, glycolipides et glycosaminoglycanes. Les glucides libres, à l'inverse, ne sont attachés à aucune structure non glucidique. Le principal sucre libre du lait de la plupart des mammifères est le lactose, disaccharide composé d'une molécule de glucose liée à une molécule de galactose en liaison  $\beta$ 1-4. Les autres glucides libres du lait sont les oligosaccharides du lait (Georgi et al., 2013). Dans la suite de notre travail, seule la fraction libre des oligosaccharides du lait est considérée (MOs).

Les oligosaccharides du lait peuvent contenir jusqu'à cinq monosaccharides différents : le glucose (Glc), le galactose (Gal), le N-acétylglucosamine (GlcNAc), le fucose (Fuc) et l'acide N-acétylneuraminique (NeuAc ou Neu5Ac) (Chen, 2015). Le glucose et le galactose sont deux monosaccharides simples à six carbones (Tableau 2) tandis que les autres monosaccharides sont des glucides dérivés, c'est-à-dire des monosaccharides qui incluent des groupes fonctionnels liés sur un des carbones à la place d'un groupe hydroxyle (-OH) (Nelson et al., 2021). Le N-acétylglucosamine (GlcNAc) est un monosaccharide à six carbones sur lequel la fonction hydroxyle (-OH) du carbone 2 a été remplacée par un groupe N-acétyl (CH<sub>3</sub>CONH-) (Tableau 2), le fucose possède un groupe méthyl (-CH<sub>3</sub>) à la place d'un groupe hydroxyméthyle (-CH<sub>2</sub>-OH) sur le carbone 6 (Tableau 2) et l'acide N-acétylneuraminique (NeuAc) est une condensation du pyruvate et du N-acétylmannosamine (Tableau 2) (Seeberger, 2022). Quelques oligosaccharides du lait ont été découvert possédant deux autres monosaccharides, le N-acétylgalactosamine (GalNAc), isomère du GlcNAc qui diffère par la position du groupe hydroxyle sur le carbone 4 (Tableau 2) et l'acide N-glycolylneuraminique (NeuGc), dérivé de NeuAc qui diffère au carbone 5 sur lequel le résidu N-acétyl est hydroxylé (Tableau 2). Ce dernier, présent chez la plupart des mammifères, est cependant absent chez l'homme (Chen, 2015). Le glucose peut être en conformation anomérique  $\alpha$  ou  $\beta$  tandis que le galactose et le N-acétylglucosamine sont toujours en conformation  $\beta$  et NeuAc, Fuc et NeuGc en conformation  $\alpha$  (Chen, 2015).

Tableau 2 : Représentation des sept monosaccharides entrant dans la structure des oligosaccharides du lait avec leurs nomenclatures visuelles respectives. Les légendes des nomenclatures sont disponibles dans le Tableau 5 et décrites au paragraphe III.

Monosaccharide (abréviation)	Glucose (Glc)	Galactose (Gal)	N-acétylglucosamine (GlcNAc)	N-acétylgalactosamine (GalNAc)	Fucose (Fuc)	Acide N-acétylneuraminique (NeuAc)	Acide N-glycolylneuraminique (NeuGc)
Structure							
Nomenclature SNFG	●	●	■	■	▲	◆	◆
Nomenclature Oxford	□	◇	■	◆	◇	★	☆

La composition de la majorité des oligosaccharides du lait débute par du glucose dans la partie terminale réductrice auquel se lie un galactose par une liaison  $\beta$ 1-4, formant ainsi une molécule de lactose ( $\text{Gal}\beta$ 1-4Glc) (Figure 3). Dans certains cas, le glucose est remplacé par le monosaccharide N-acétylglucosamine (GlcNAc), lié au galactose en  $\beta$ 1-4 formant ainsi une molécule de N-acétyllactosamine ( $\text{Gal}\beta$ 1-4GlcNAc) (Balogh et al., 2015). Cette structure initiale peut être liée en  $\beta$ 1-3 ou  $\beta$ 1-6 à deux types de disaccharides composés de N-acétylglucosamine et galactose. Selon la liaison entre ces deux monosaccharides, on distingue deux motifs. Le motif lacto-N-biose lorsque la liaison entre le galactose et le N-acétylglucosamine est de type  $\beta$ 1-3 ( $\text{Gal}\beta$ 1-3GlcNAc) et le motif N-acétyllactosamine dans le cadre d'une liaison de type  $\beta$ 1-4 ( $\text{Gal}\beta$ 1-4GlcNAc) entre le galactose et le N-acétylglucosamine (Figure 3). Ces deux disaccharides peuvent être répétés plusieurs fois, liés entre eux par des liaisons  $\beta$ 1-3, donnant lieu à une structure linéaire également appelée *para*-HMO, ou des liaisons  $\beta$ 1-6 pour une structure branchée, appelée *iso*-HMO (Bode, 2012). Il faut noter que la structure lacto-N-biose ne peut se trouver qu'à l'extrémité non réductrice de la molécule, terminant ainsi l'élongation, alors que N-acétyllactosamine peut être interne à la molécule ou la terminer (Chen, 2015).

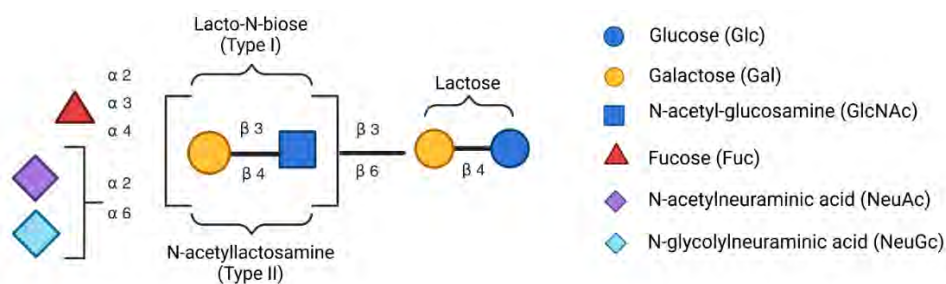


Figure 3 : Structure des oligosaccharides du lait représentée avec la nomenclature SNFG. Figure créée avec Biorender, adaptée de Bode and Jantscher-Krenn (2012).

Cette chaîne principale peut être modifiée par l'ajout d'une ou plusieurs molécules de fucose liées en  $\alpha$ 1-2,  $\alpha$ 1-3 ou  $\alpha$ 1-4 et/ou une ou plusieurs molécules d'acide N-acétylneuraminique liées en  $\alpha$ 2-3 ou  $\alpha$ 2-6 (Figure 3) (Bode, 2020). Les oligosaccharides présentent une diversité importante de structures, portée à la fois par la variété des monosaccharides pouvant entrer dans leur composition et par la multiplicité des types de liaisons glycosidiques possibles. La diversité de liaisons s'explique par les configurations  $\alpha$  ou  $\beta$  du carbone anomérique d'un monosaccharide, la liaison de ce dernier au groupe hydroxyle de n'importe quel autre carbone de l'autre monosaccharide et le fait que plusieurs groupes hydroxyles d'un même monosaccharide peuvent être engagés dans une liaison glycosidique, à l'origine des structures branchées. Lebrilla et al. (2022) ont ainsi calculé que la construction d'un oligosaccharide incluant quatre monosaccharides identiques, tel que le glucopyranose, peut donner lieu à 1792 structures différentes. De plus, lorsque la composition en monosaccharides est identique entre deux molécules, mais les liaisons entre ces derniers sont variables, on dit que ce sont des isomères. Chen (2015) a caractérisé douze liaisons glycosidiques dans les oligosaccharides

du lait humain, ce nombre pouvant être augmenté en prenant en compte le N-acétylgalactosamine et l'acide N-glycolylneuraminique (Tableau 3).

Tableau 3 : Liaisons glycosidiques entrant dans la composition des oligosaccharides du lait (A) structures fréquemment rencontrées, adapté de Chen (2015) (B) structures dites déviantes, adapté de Durham et al. (2023) et Jin et al. (2023).

A		B	
Liaison glycosidique	Structure	Liaisons dites déviantes	
Liaison galactosidique		Liaison sialidique	
Liaison N-acétylglucosaminique		Liaison avec le monosaccharide GalNAc	
Liaison fucosidique		Motif LacdiNAc	
Liaison sialidique			

	Glucose (Glc)
	Galactose (Gal)
	N-acetyl-glucosamine (GlcNAc)
	N-acetyl-galactosamine (GalNAc)
	Fucose (Fuc)
	N-acetylneuraminic acid (NeuAc)
	N-glycolylneuraminic acid (NeuGc)



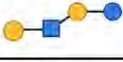

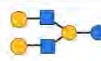
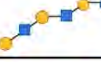
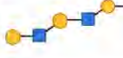


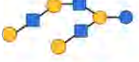



Ainsi il existe une grande diversité d'oligosaccharides du lait qui diffèrent en taille, charge (négativement chargés lors de la présence d'un acide N-acétylneuraminique) et abondance. Dans le lait humain jusqu'à 200 molécules différentes ont été observées (Ninonuevo et al., 2006). En fonction de leur composition en monosaccharides, ces dernières sont généralement réparties dans des classes.

### C. Classification des oligosaccharides du lait

Les classifications des oligosaccharides du lait reposent sur la composition en monosaccharides des molécules et/ou sur les liaisons entre certains de ces monosaccharides. Une première classification consiste à grouper les oligosaccharides dans treize séries en fonction de leurs unités de base. Des structures ont été définies comme les noyaux ou structures principales des oligosaccharides du lait. Ces structures principales, ne contiennent aucune molécule de fucose, d'acide N-acétylneuraminique ou d'acide N-glycolylneuraminique. Elles servent de base pour décrire les multiples possibilités de structures existantes après addition de résidus de fucose, d'acide N-acétylneuraminique ou d'acide N-glycolylneuraminique (Ayechu-Muruzabal et al., 2018).

Comme présenté par Kobata (2017) dans l'ouvrage *Prebiotics and Probiotics in Human Milk*, les premières structures considérées comme centrales étaient le lactose, le lacto-N-tetraose (LNT) et le lacto-N-*neo*-tetraose (LNnT) (Kuhn and Baer, 1956; Kuhn and Gauhe, 1962). Puis, en 1967, les structures des lacto-N-hexaose (LNH) et lacto-N-*neo*-hexaose (LNnH) (Kobata and Ginsburg, 1972a, 1972b) ont été déterminées et plusieurs dérivés fucosylés et sialylés ont été découverts, intégrant ces deux molécules à la liste des structures principales. Par la suite, entre 1977 et 2009, un total de treize structures ont été mises en évidence (Tableau 4) qui entrent dans la composition d'un grand nombre d'oligosaccharides du lait (Yamashita et al., 1977; Tachibana et al., 1978; Bruntz et al., 1988; Strecker et al., 1992; Haeuw-Fievre et al., 1993; Amano et al., 2009). Les structures de plus grande taille comportent un nombre d'isomères d'autant plus important puisque les possibilités de liaisons à des fucoses et/ou acides N-acétylneuraminiques sont augmentées. Néanmoins cette classification a été établie sur la base des structures découvertes dans le lait humain et devrait donc être adaptée pour l'étude des oligosaccharides du lait de diverses espèces mammifères qui présentent d'autres particularités de structure (I).

Tableau 4 : Liste des treize noyaux des oligosaccharides du lait qui permettent de caractériser un grand nombre d'oligosaccharides du lait. Créé sur Biorender, adapté de Chen (2015) et Kobata (2017).

Noyau	Nom	Abréviation	Structure	Référence
I	Lactose	Lac		
II	Lacto-N-tetraose	LNT		Kuhn, Baer (1956)
III	Lacto-N- <i>neo</i> -tetraose	LNnT		Kuhn, Gauhe (1962)
IV	Lacto-N-hexaose	LNH		Kobata, Ginsburg (1972a)
V	Lacto-N- <i>neo</i> -hexaose	LNnH		Kobata, Ginsburg (1972b)
VI	<i>Para</i> -lacto-N-hexaose	pLNH		Yamashita, Tachibana, Kobata (1977)
VII	<i>Para</i> -lacto-N- <i>neo</i> -hexaose	pLNnH		Yamashita, Tachibana, Kobata (1977)
VIII	Lacto-N-octaose	LNO		Tachibana, Yamashita, Kobata (1978)
IX	Lacto-N- <i>neo</i> -octaose	LNnO		Tachibana, Yamashita, Kobata (1978)
X	<i>Iso</i> -lacto-N-octaose	lLNO		Strecker et al. (1992)
XI	<i>Para</i> -lacto-N-octaose	pLNO		Haeuw-Fievre et al. (1993)
XII	Lacto-N-decaose	LND		Bruntz et al. (1988)
XIII	Lacto-N-neodecaose	LNnD		Amano et al. (2009)

A titre d'exemple, le LNT est la structure de base de douze oligosaccharides du lait : trois isomères fucosylés, deux isomères décorés par deux molécules de fucose, deux isomères décorés avec un acide N-acétylneuraminique, une molécule avec deux acides N-acétylneuraminiques, deux isomères possédant à la fois un fucose et un acide N-acétylneuraminique, une molécule avec un acide N-acétylneuraminique et deux fucoses et une molécule fucosylée avec deux acides N-acétylneuraminiques.

Une autre classification basée sur la composition en monosaccharides de l'oligosaccharide du lait distingue les oligosaccharides acides, molécules chargées négativement contenant au moins un résidu chargé négativement (-COOH) NeuAc et/ou NeuGc, des oligosaccharides du lait neutres, molécules qui ne contiennent pas les résidus NeuAc et NeuGc (Mijan et al., 2011).

Ces groupes se divisent alors en sous-groupe en fonction de la présence d'une ou plusieurs unités fucose : neutre fucosylé et acide fucosylé.

Enfin, une autre classification est basée sur le type de liaison du disaccharide lié au lactose, c'est-à-dire entre les molécules de galactose et N-acétylglucosamine. Si une molécule de lacto-N-biose ( $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}$ ) est liée au lactose, l'oligosaccharide est dit de type I, tandis que si le lactose est lié au disaccharide N-acétyllactosamine ( $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ ), l'oligosaccharide appartient au type II (Figure 3).

#### D. Des structures dites déviantes

Smith et Cummings (2017) ont établi des règles pour déterminer la structure des oligosaccharides du lait humain. Ces dernières stipulent que l'ensemble des oligosaccharides du lait sont une extension du lactose et composés uniquement de cinq types de monosaccharides (Glucose, galactose, N-acétylglucosamine, fucose et acide N-acétylneuraminique). Le monosaccharide N-acétylglucosamine est le seul N-acétylhéxosamine, il est lié au lactose et n'est jamais en position terminale car toujours lié à un galactose pour donner les structures de type I ( $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}$ ) ou II ( $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ ). Enfin les structures de type I sont terminales et ne sont jamais liées à d'autres résidus monosaccharides. Cependant, de nombreuses études ont mis en avant des structures qui ne respectent pas ces règles dans le lait des mammifères non humains, mais également humains. Remoroza et al. (2020) ont détecté, entre autres, l'oligosaccharide Lacto-N-novopentasyllactose I ( $\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6)[\text{Gal}(\beta 1-3)]\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$ ) dans le lait humain, qui possède un galactose terminal, et ne respecte donc pas la règle stipulant que le lactose est lié au disaccharide ( $\text{Gal-GlcNAc}$ ). D'autres auteurs ont décrit des structures de galactosyllactoses, où le galactose est lié au lactose, comme appartenant aux oligosaccharides du lait humain (Urashima et al., 2018; Salminen et al., 2020; Hanisch and Kunz, 2021). Les auteurs proposent de classer ces oligosaccharides du lait dans un sous-type intitulé oligosaccharides du lait à forte teneur en galactose (High galactose human milk oligosaccharides). Chez l'humain, Chen (2015) décrit les structures ne respectant pas ces généralités comme déviantes. Cela inclut les molécules contenant (i) le monosaccharide N-acétylgalactosamine à l'extrémité non réductrice de la molécule, (ii) les molécules dont l'extrémité réductrice n'est pas du lactose et (iii) certaines molécules composées de deux galactoses à la suite. Ces structures ont également été observées chez d'autres espèces de mammifères (Urashima et al., 2001).

D'autres oligosaccharides déviants, présentant des structures similaires aux glycosphingolipides, lipides liés à des oses, ont été découverts dans le lait de mammifères non humains (Figure 4) tels que les girafes, les bovins, les caprins, les macaques rhésus et les lions (Uemura et al., 2005; Goto et al., 2010; Mineguchi et al., 2018; Remoroza et al., 2020). De même Jin et al. (2023) ont analysé les oligosaccharides du lait de certains mammifères non étudiés jusqu'à présent tels que l'alpaga, le béluga, le rhinocéros noir et l'hippopotame pygmée. Leurs analyses ont montré la présence d'un motif appelé LacdiNAc ( $\text{GalNAc}\beta 1-$

4GlcNAc), habituellement rencontré dans des glucides liés à des protéines. Ils ont également détecté des motifs LacdiNAc sialylés tels que la structure GalNAc $\beta$ 1-4(Neu5Ac $\alpha$ 2-6)GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc, mais également des molécules de taille plus importante, dans le lait des impalas et bélugas. Cet article décrit également la présence d'acide glucuronique, un glucose oxydé sur le carbone 6, dans des oligosaccharides du lait d'impalas mais également de rhinocéros noir, dauphins et moutons domestiques.

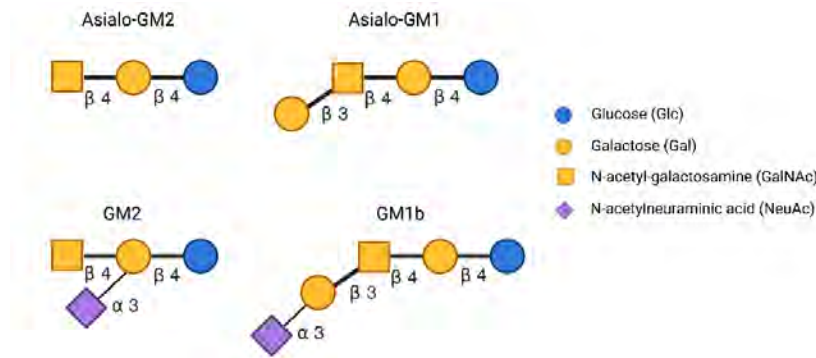


Figure 4 : Structures des oligosaccharides du lait similaires aux glycosphingolipides identifiés chez certains mammifères non humains. Figure créée avec Biorender, adaptée de Remoroza et al. (2020).

Ces récentes découvertes interrogent les connaissances actuelles sur les oligosaccharides du lait et laissent penser que leur diversité est encore sous-estimée et que de nombreuses nouvelles structures sont encore à découvrir.

#### E. Une analyse quantitative et qualitative complexe

Les structures des oligosaccharides du lait étant particulièrement complexes, avec de nombreux isomères, plusieurs techniques sont utilisées pour étudier les oligosaccharides du lait mais aucune n'est généralisée à ce jour (Zhao et al., 2017).

Après une étape visant à éliminer le lactose (van Leeuwen, 2019; Porfirio et al., 2020), l'identification des oligosaccharides du lait combine une étape de séparation et de détection. La séparation repose sur la chromatographie ou l'électrophorèse capillaire. Cette dernière ne permet pas de distinguer les isomères puisque la migration à travers la colonne dépend du ratio taille-charge qui est identique entre les isomères d'une même molécule, leur composition en monosaccharides étant la même (van Leeuwen, 2019). On distingue plusieurs techniques de chromatographie telles que la chromatographie d'échange d'ions à pH élevé avec détection ampérométrique (HPAEC) (Thurl et al., 1996, 1997; Finke et al., 1999), la chromatographie en phase inversée (RP HPLC), la chromatographie à interaction hydrophile (HPLC) (Ruhaak and Lebrilla, 2012) ou encore la chromatographie électrocinétique micellaire (Porfirio et al., 2020). Ces méthodes de séparation permettent l'identification des isomères, mais elles nécessitent souvent des étapes préalables de marquage ou modification des molécules ce qui les rend coûteuses en temps. De plus, elles doivent être suivies d'une

identification structurale à l'aide de standards, or ces derniers ne sont pas disponibles pour tous les oligosaccharides et peuvent être coûteux.

Les techniques de spectrométrie de masse sont plus rapides mais elles ne permettent pas de distinguer les isomères de monosaccharides (glucose et galactose ou GlcNAc et GalNAc) ni l'anomérisation (Ruhaak and Lebrilla, 2012). La digestion par des exoglycosidases, des enzymes qui hydrolysent les glucides avec des spécificités de monosaccharide, de configuration anomérique et de position de la liaison, et la comparaison aux standards permettent d'identifier plus précisément les structures (Weng et al., 2022). Une autre façon de distinguer les isomères est de déterminer précisément le type de liaison entre chaque composant. Pour ce faire, les groupes hydroxyles libres (-OH) sont méthylés puis les liaisons glycosidiques sont clivées par une hydrolyse acide. Les monosaccharides ainsi libérés sont partiellement méthylés, le groupe précédemment engagé dans la liaison étant le seul groupe hydroxyle libre (Haslam et al., 2022). La séparation par chromatographie liquide suivie d'une spectrométrie de masse avec ionisation et fragmentation permet également d'identifier les isomères.

## II. Mécanisme de biosynthèse des oligosaccharides du lait

### A. Synthèse des oligosaccharides du lait dans la glande mammaire

Les mécanismes de synthèse des oligosaccharides du lait ont été principalement étudiés chez l'humain. Bien que les mécanismes de synthèse ne soient pas entièrement élucidés, il semblerait qu'ils soient conservés chez certains groupes taxonomiques. On distingue plusieurs étapes, l'élongation, le branchement, la fucosylation et la sialylation. Seule l'étape d'élongation est commune à l'ensemble des oligosaccharides du lait.

La majeure partie des oligosaccharides du lait débute par une molécule de lactose, située sur l'extrémité réductrice (Urashima et al., 2009a). Le lactose est synthétisé dans l'appareil de Golgi des cellules épithéliales de la glande mammaire à partir du donneur l'Uridine-diphosphate galactose (UDP-Gal) et de l'accepteur glucose. Le glucose extracellulaire, issu du plasma, est capté par les cellules épithéliales via le transporteur de glucose 1 (GLUT1) (Figure 5). Une partie du glucose est transporté dans l'appareil de Golgi par GLUT1 tandis que les autres molécules de glucose sont phosphorylées dans le cytoplasme par des hexokinases (HK) pour donner du glucose-6-phosphate. La phosphoglucomutase (PGM1) transfère un groupe phosphate du carbone 6 du glucose-6-phosphate sur le carbone 1 avant que l'UDP-glucose-pyrophosphorylase (UGP2) ne remplace le groupe phosphate par l'uridine diphosphate (UDP). L'UDP-glucose (UDP-Glc) est alors converti en UDP-galactose par l'enzyme galactose épimérase (GALE) avant d'être transféré dans l'appareil de Golgi par le translocateur UDP-galactose (SLC35A2) (Sadovnikova et al., 2021) (Figure 5). Au sein de l'appareil de Golgi, la lactose synthase lie l'UDP-galactose et le glucose via une liaison glycosidique  $\beta$ 1-4 par transglycosylation (Figure 5). Le complexe enzymatique lactose synthase est un hétérodimère composé de l'enzyme  $\beta$ 1-4 galactosyltransférase et de la protéine du lait  $\alpha$ -lactalbumine

(Blank et al., 2012). En l'absence de l' $\alpha$ -lactalbumine, l'enzyme  $\beta$ 1-4 galactosyltransférase transfère une molécule d'UDP-Galactose sur un monosaccharide N-acétylglucosamine (GlcNAc) terminal formant ainsi le disaccharide N-acétyllactosamine (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) (Ramakrishnan et al., 2002).

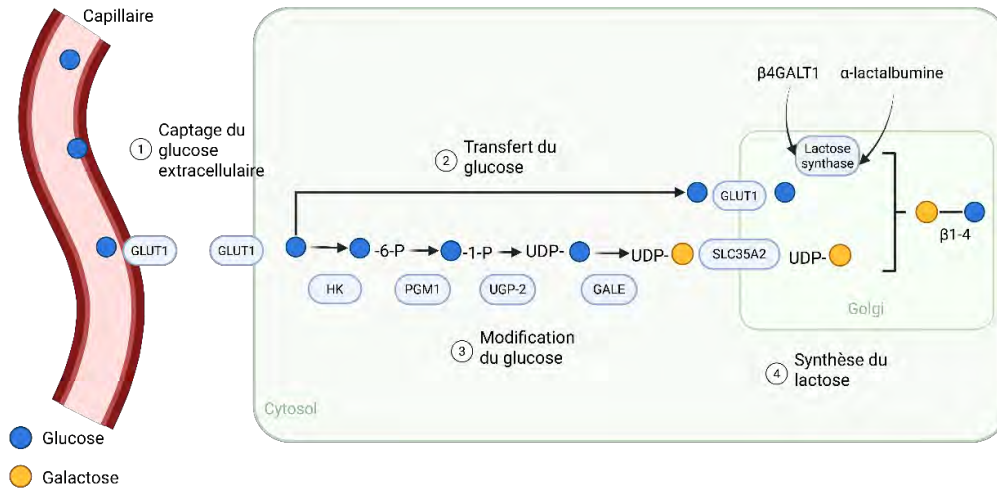


Figure 5 : Synthèse du lactose dans les cellules épithéliales de la glande mammaire. GLUT1 : transporteur glucose 1 ; HK : hexokinases ; PGM1 : phosphoglucomutase ; UGP-2 : UDP-glucose-pyrophosphorylase ; GALE : galactose épimérase ; SLC35A2 : translocateur UDP-galactose ; UDP-glucose : Uridine-diphosphate glucose ; UDP-galactose : Uridine-diphosphate galactose. Figure créée avec Biorender, adaptée de Sadovnikova et al. (2021).

Une fois le lactose synthétisé, l'étape d'élongation consiste à ajouter les monosaccharides N-acétylglucosamine et galactose à la molécule de lactose (Figure 6). Ces ajouts sont réalisés par des glycosyltransférases, qui ajoutent des monosaccharides sur des précurseurs spécifiques selon différentes liaisons. Les glycosyltransférases ne sont pas spécifiques de la glande mammaire mais sont également présentes dans d'autres parties du corps où elles jouent un rôle dans la glycosylation des cellules et des mucines, protéines transmembranaires ou sécrétées formant la couche de mucus. La plupart de ces enzymes se trouvent dans l'appareil de Golgi et catalysent la transglycosylation par transfert d'un monosaccharide donneur vers un accepteur (Varki et al., 1999). L'enzyme  $\beta$ 1-3-N-acétylglucosaminyltransferase ( $\beta$ 3GlcNAcT ; EC number 2.4.1.149) lie le N-acétylglucosamine au lactose en  $\beta$ 1-3, il s'agit d'une élongation. Lorsque la liaison est en  $\beta$ 1-6, c'est l'enzyme  $\beta$ 1-6-N-acétylglucosaminyltransferase ( $\beta$ 6GlcNAcT ; EC number 2.4.1.150) qui catalyse la liaison. Ce dernier phénomène n'a lieu que lorsque qu'une molécule de N-acétylglucosamine est déjà liée au lactose en  $\beta$ 1-3 et donne lieu à des oligosaccharides du lait branchés (Kobata, 2017). Concernant les oligosaccharides du lait humain, Sprenger et al. (2022) précisent que l'addition de N-acétylglucosamine semble être suivie séquentiellement par l'ajout de galactose puisque peu d'intermédiaires lacto-N-triose (GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc) sont trouvés dans le lait humain. Il y aurait donc une action alternée de N-acétylglucosaminyltransferase (GlcNAcT) et galactosyltransferase (GalT) permettant de brancher le monosaccharide N-acétylglucosamine

et le galactose successivement. La  $\beta 4$ -Galactosyltransférase donne lieu à des oligosaccharides de type II en liant le galactose au N-acétylglucosamine en  $\beta 1-4$ , formant ainsi un disaccharide N-acétyllactosamine ( $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ ), tandis que la  $\beta 3$ -Galactosyltransférase produit des oligosaccharides de type I en liant le galactose au N-acétylglucosamine en  $\beta 1-3$ , formant ainsi un disaccharide lacto-N-biose ( $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}$ ) (Figure 6). Dans ce dernier cas l'élongation du sucre s'arrête (Kobata, 2017).

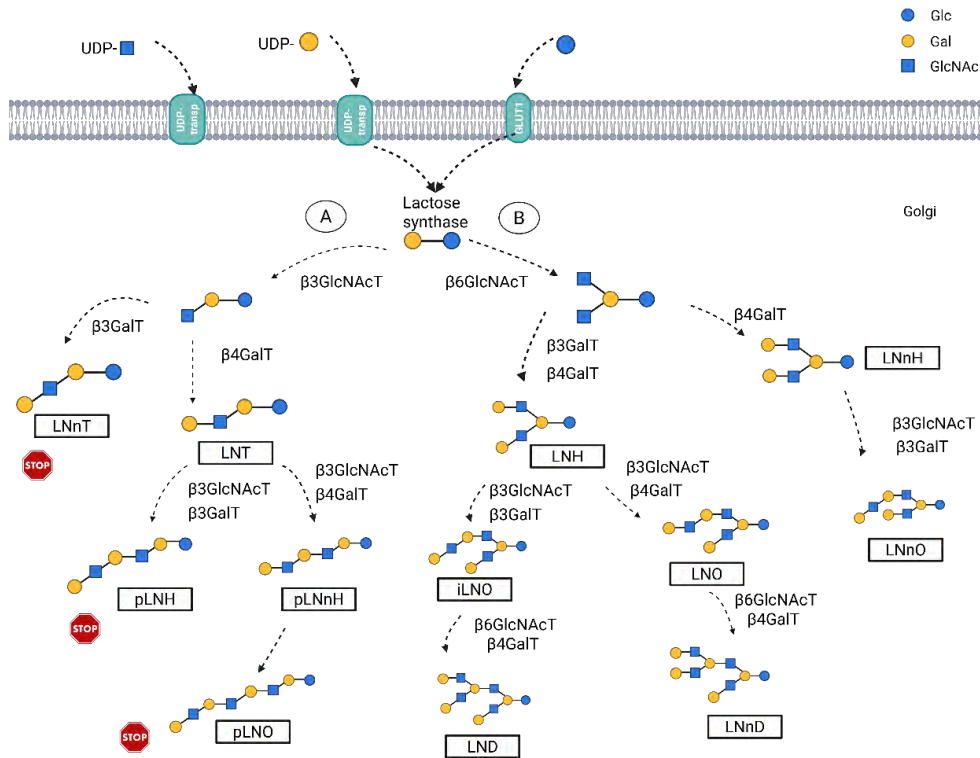


Figure 6 : Biosynthèse des treize noyaux d'oligosaccharides du lait (A) élongation et (B) branchement à partir d'une molécule de lactose. Les signes stop indiquent que l'élongation n'est plus possible (après le disaccharide lacto-N-biose ( $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}$ )).  $\beta 3\text{GlcNAcT}$  :  $\beta 1-3$ -N-acétylglucosaminyltransférase ;  $\beta 6\text{GlcNAcT}$  :  $\beta 1-6$ -N-acétylglucosaminyltransférase ;  $\beta 3\text{GalT}$  :  $\beta 3$ -Galactosyltransférase ;  $\beta 4\text{GalT}$  :  $\beta 4$ -Galactosyltransférase ; LNT : Lacto-N-tetraose ; LNnT : Lacto-N-neo-tetraose ; LNH : Lacto-N-hexaose ; LNnH : Lacto-N-neo-hexaose ; pLNH : Para-lacto-N-hexaose ; pLNnH : Para-lacto-N-neo-hexaose ; LNO : Lacto-N-octaose ; LNnO : Lacto-N-neo-octaose ; iLNO : Iso-lacto-N-octaose ; pLNO : Para-lacto-N-octaose ; LND : Lacto-N-decaose ; LNnD : Lacto-N-neo-decaose. Figure créée avec Biorender, adaptée de Blank et al. (2012) et Kobata (2017).

Chez l'humain, l'ajout de fucose est catalysé par des fucosyltransférases (FUT). Cette enzyme catalyse l'ajout du donneur guanosine diphosphate fucose (GDP-Fuc) sur l'accepteur, lactose ou structure principale d'oligosaccharides du lait. On distingue plusieurs FUT selon le type de liaison utilisée pour lier le fucose (Sprenger et al., 2022). L'enzyme  $\alpha 2\text{FUT}$  relie le fucose en position  $\alpha 1-2$  au galactose terminal, l' $\alpha 3\text{FUT}$  attache le fucose en position  $\alpha 1-3$  au N-acétylglucosamine et l' $\alpha 3/4\text{FUT}$  peut lier le fucose en position  $\alpha 1-3/4$  au N-acétylglucosamine ou en position  $\alpha 1-3$  au glucose (Blank et al., 2012). Certains gènes responsables de l'expression de ces fucosyltransférases ont été analysés chez l'humain et sont discutés dans le Chapitre 2 Patron de diversité des oligosaccharides du lait. L'ajout d'acide N-acétylneuraminique est catalysé par des sialyltransférases. Les enzymes St3Gal4 et St6Gal1 ajoutent N-

acétylneuraminique à la structure principale via une liaison  $\alpha$ 2-3- ou  $\alpha$ 2-6- respectivement. L'absence du monosaccharide acide N-glycolylneuraminique dans la composition des oligosaccharides du lait humain s'explique par la suppression d'activité de l'hydrolase convertissant la cytidine monophosphate N-acétylneuraminique (CMP-NeuAc) en cytidine monophosphate N-glycolylneuraminique (CMP-NeuGc) dans la glande mammaire (Urashima et al., 2013).

#### B. Présence des oligosaccharides du lait dans d'autres fluides biologiques

Chez l'humain, les oligosaccharides du lait ont également été détectés dans certains liquides biologiques maternels, au cours de la gestation. Ainsi, dès le deuxième trimestre de gestation, des MOs ont été quantifiés dans le sang et l'urine de la mère mais également dans le liquide amniotique (Wise et al., 2018; Jantscher-Krenn et al., 2019, 2022). Une étude a démontré que la concentration en MOs dans le sérum maternel est comprise entre 0.1 et 1.8 nmol.mL<sup>-1</sup>, dont une forte proportion (43 à 64 %) appartient aux types sialylés, la proportion de MOs fucosylés augmentant au cours de la gestation (Jantscher-Krenn et al., 2019). Une étude de perfusion placentaire *ex vivo* chez l'humain a démontré que le 2'-FL pouvait être transféré de la mère au fœtus, suggérant que les MOs circulant chez la mère lors de la gestation peuvent traverser la barrière placentaire, expliquant leur présence dans le sang fœtal (Hirschmugl et al., 2019).

L'origine des MOs dans ces différents liquides biologiques s'expliquerait par une production précoce dans la glande mammaire. Dès le deuxième trimestre, les cellules épithéliales mammaires commenceraient à produire des MOs dont une partie serait sécrétée dans la circulation maternelle. Une fraction serait alors filtrée par les reins avant d'atteindre l'urine maternelle, tandis qu'une part pourrait traverser le placenta afin d'entrer dans la circulation fœtale. Les reins du fœtus filtreraient alors une partie des MOs du sang fœtal, qui seraient excrétés dans l'urine fœtale, expliquant leur présence dans le liquide amniotique. Dès 16 semaines de gestation, le fœtus commence à avaler du liquide amniotique, pour atteindre jusqu'à 700 mL d'absorption par jour en fin de gestation. Ainsi en avalant ce liquide, contenant les MOs de l'urine fœtale, le fœtus présente une exposition digestive et systémique aux MOs avant la naissance (Jantscher-Krenn et al., 2022).

#### III. Complexité structurale et nomenclature : absence de consensus autour de la nomenclature des oligosaccharides du lait

Le respect de la nomenclature permet une homogénéité des informations et donc la comparaison entre les études. La nomenclature officielle IUPAC détaille les conventions à respecter pour nommer les oligosaccharides (McNaught, 1996). On distingue plusieurs formes de nomenclature pour les oligosaccharides du lait comme illustré ci-dessous avec le 2'-fucosyllactose :

- La forme étendue où chaque monosaccharide est précédé de sa forme anomérique et les liaisons sont indiquées entre parenthèse entre chaque monosaccharide inclus dans la liaison :  $\alpha$ -L-fucosyl-(1→2)- $\beta$ -D-galactosyl-(1→4)- $\beta$ -D-glucose

- La forme étendue abrégée correspond à la forme étendue mais les monosaccharides sont indiqués en forme abrégée :  $\alpha$ -L-Fuc-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glc
- La forme condensée est la plus commune car facilement lisible par son format compact : Fuc( $\alpha$ 1-2)Gal( $\beta$ 1-4)Glc
- Le nom trivial 2'-fucosyllactose
- Le nom trivial abrégé 2'-FL

Des noms triviaux ont été attribués à certains oligosaccharides du lait par Richard Kuhn (Institut Max-Planck, Allemagne) lors de leur découverte. La nomenclature des molécules découvertes ultérieurement s'est alors basée sur cette dernière pour nommer les oligosaccharides du lait (Gauhe et al., 1954; Kobata and Ginsburg, 1969; Kobata et al., 1969; Grimmonprez, 1971). Les isomères respectent un nom trivial initial auquel il est ajouté un numéro aux nouvelles structures découvertes. Ainsi il existe six oligosaccharides du lait dont le nom trivial est Lacto-N-fucopentaose numérotés de I à VI.

En raison du grand nombre d'oligosaccharides du lait, certaines confusions sont observées sur les noms triviaux des molécules dans les différents articles scientifiques. Ainsi Urashima et al. (2018) et Wu et al. (2010) n'ont pas la même représentation structurale pour le difucosyl-*para*-lacto-N-hexaose II (DF-*para*-LNH II) (Figure 7). La structure de Wu et al. (2010) correspond chez Urashima et al. (2018) à un isomère de DF-*para*-LNH II, le difucosyl-*para*-lacto-N-hexaose (DF-*para*-LNH). Lorsque l'on s'intéresse aux premiers articles décrivant ces structures on constate que la publication d'Urashima et al. (2018) assemble correctement les noms triviaux aux structures (Yamashita et al., 1977; Ashline et al., 2014).

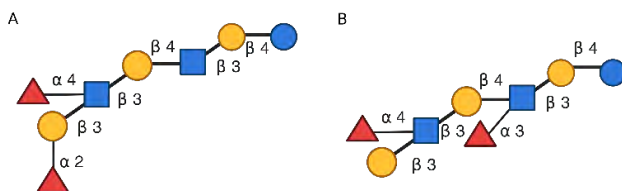


Figure 7 : Structure du difucosyl-*para*-lacto-N-hexaose II (DF-*para*-LNH II) selon (A) Urashima et al. (2018) et (B) Wu et al. (2010). Les structures diffèrent par la position d'un des résidus fucose. Figure créée avec Biorender.

De plus, il n'existe pas de consensus quant à la nomenclature à utiliser pour nommer les molécules et les auteurs peuvent donc faire référence aux noms systématiques, abrégés, triviaux mais également à des caractéristiques chimiques des molécules. Trevisi et al. (2020) désignent les oligosaccharides du lait par leur composition qui représente le nombre de chacun des monosaccharides présents dans la molécule (3\_1\_0\_0\_0 pour Lacto-N-*neotetraose* et Lacto-N-*tetraose* qui indique 3 hexoses que sont le glucose et le galactose et le N-acétylglucosamine). Aldredge et al. (2013) utilisent le nom trivial abrégé (LNnT) tandis que Remoroza et al. (2020) se réfèrent au nom trivial (Lacto-N-*neotetraose*). Enfin, c'est la

forme condensée (Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)Glc) qui est indiquée par Albrecht et al. (2014).

Certaines molécules découvertes récemment n'ont d'ailleurs pas de noms triviaux et sont donc désignées par des noms regroupant leur classification neutre ou acide et leur composition en monosaccharides. Remoroza et al. (2020) désignent l'oligosaccharide du lait Fucosyllacto- N-*neo*-hexaose b (Gal( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-3)]GlcNAc( $\beta$ 1-3)[Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-6)]Gal( $\beta$ 1-4)Glc) sous le nom N4120b indiquant qu'il s'agit d'un oligosaccharide du lait neutre composé de quatre hexoses, un fucose et deux N-acétylglucosamines. Albrecht et al. (2014) donnent uniquement des numéros pour se référer aux oligosaccharides, précédés d'un N pour les oligosaccharides du lait neutres ou d'un A pour les oligosaccharides du lait acides.

Il existe également une nomenclature visuelle basée sur les symboles. Cette représentation permet de visualiser facilement des molécules complexes. Dans la littérature on retrouve généralement deux représentations, la Symbol Nomenclature for Glycans (SNFG) et la notation Oxford, bien que la SNFG soit la plus communément utilisée pour les oligosaccharides du lait.

La représentation SNFG regroupe des symboles de formes et couleurs spécifiques à chaque monosaccharide. Les ronds représentent les hexoses, sucres à 6 carbones, les carrés sont les N-acetylhexosamines, les triangles représentent les désoxyoses, pour lesquels un groupement hydroxyle a été remplacé par un atome d'hydrogène tandis que les diamants sont les acides sialiques. Les liaisons glycosidiques sont représentées par des lignes dont l'orientation respecte le sens des aiguilles d'une montre (Tableau 5). Lorsque les formes sont blanches, cela signifie que la molécule précise n'a pas pu être identifiée, uniquement son type. De même, lorsque la position exacte d'un monosaccharide n'est pas connue, des crochets indiquent l'ensemble des positions où la molécule est attendue (Varki et al., 2015). Cette représentation est utilisée depuis une quarantaine d'années, hébergée par le National Center for Biotechnology Information (NCBI) et gérée par un groupe de chercheurs internationaux (Neelamegham et al., 2019). Ces symboles sont également ceux utilisés par plusieurs bases de données chimiques de références telles que PubChem, UniCarbKB, KEGG Pathways, GlyGen ou encore GlyTouCan. Pour ces raisons, la représentation SNFG est celle utilisée dans ce manuscrit.

La notation Oxford a été créée par des scientifiques de l'université d'Oxford en 2009. Chaque monosaccharide est représenté par un symbole unique tandis que les liaisons  $\alpha$  sont indiquées par des lignes en pointillés et les liaisons  $\beta$  avec des lignes pleines (Tableau 5). Les angles des liaisons indiquent le carbone engagé de la même façon que dans la représentation SNFG (Harvey et al., 2009). Cette nomenclature est moins répandue que la SNFG dans les publications sur les oligosaccharides du lait. A notre connaissance, Albrecht et al. (2014) est

l'unique article analysant la composition du lait de mammifères en oligosaccharides du lait utilisant la notation d'Oxford.

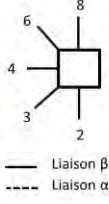
Tableau 5 : Nomenclature visuelle des monosaccharides selon (A) la représentation SNFG et (B) la notation Oxford. Seuls les monosaccharides entrant dans la composition des oligosaccharides du lait sont représentés. Adapté de Varki et al. (2015) et Harvey et al. (2009).

A

Forme	Blanc	Bleu	Jaune	Violet	Bleu clair	Rouge
Cercle plein	Hexose ○	Glc ●	Gal ●			
Carré plein	HexNAc □	GlcNAc ■	GalNAc ■			
Triangle plein	Deoxyhexose △					Fuc ▲
Diamant plein	3-deoxy-nonulosonic acids ◇			Neu5Ac ◆	Neu5Gc ◆	

B

Hexose	Glc □	Gal ◇			
HexNAc	GlcNAc ■	GalNAc ◆			
Deoxyhexose					Fuc ▲
Acide sialique			Neu5Ac ★	Neu5Gc ☆	



Le grand nombre d'oligosaccharides du lait (MOs), dont certains n'ont pas de noms triviaux attribués, les différences de nomenclatures ainsi que les possibles erreurs de noms rendent l'analyse de la bibliographie sur les MOs complexes et l'homogénéisation des nomenclatures primordiale. Ceci est d'autant plus important que l'analyse du lait de nombreux mammifères a montré des différences dans la composition en oligosaccharides du lait inter et intra espèces. Une homogénéisation des nomenclatures est essentielle pour permettre à la communauté scientifique de comparer les oligosaccharides du lait au cours de la lactation, entre individus, espèces et conditions de vie

## Chapitre 2 Patron de diversité des oligosaccharides du lait

---

Nous avons précédemment exposé qu'il existe une grande diversité de structures de MOs. Dans ce chapitre, nous allons montrer que la présence de ces structures ainsi que leur concentration dans le lait sont influencées par de nombreux facteurs. Ces facteurs sont à l'origine des différences de composition du lait observées entre espèces mais également entre les individus d'une même espèce et pour un même individu. Nous insisterons enfin sur la difficulté à déterminer l'impact d'un facteur indépendant sur la composition en MOs en raison de l'interaction entre plusieurs facteurs. Peu de données chiffrées sont disponibles concernant la quantité des structures de MOs, les données présentées sont donc majoritairement des proportions de structure relativement aux MOs totaux.

### I. Une variabilité inter-espèce

Comme l'ont montré Durham et al. (2023) dans leur analyse de la littérature, plus de 200 structures ont été identifiées dans le lait humain contre 143 chez le bovin, 166 chez le porc, 189 chez les caprins ou encore 66 chez les ovins. En général, plusieurs structures de MOs sont identifiées dans le lait, mais seulement quelques-unes composent la majorité de la concentration en MOs. Ainsi chez le cheval, parmi 48 structures identifiées, 4 structures représentent 60% des MOs (Karav et al., 2018). De même, chez le porc, parmi 60 MOs identifiés, 6 représentent 60% du total (Mudd et al., 2016). Chez le chien, parmi 55 MOs, ce ne sont que 3 MOs qui contribuent à 90% du total (Wrigglesworth et al., 2020). La concentration des MOs dans les laits d'animaux d'élevage est également inférieure à celle du lait humain (Figure 8). Le lait mature humain contient en moyenne 12-13 g.L<sup>-1</sup> de MOs (Urashima et al., 2009a), bien plus que chez le bovin où la concentration en MOs s'élève à 200 mg.L<sup>-1</sup> dans le lait mature (Nakamura et al., 2003). De même, Martinez-Ferez et al. (2006) ont mesuré des concentrations de 250 à 300 mg.L<sup>-1</sup> de MOs dans le lait mature caprin, 10 fois plus que dans le lait mature ovin (20-40 mg.L<sup>-1</sup>). Enfin, le lait mature porcin contient environ 6 g.L<sup>-1</sup> de MOs, des valeurs plus faibles que chez l'humain mais plus élevées que dans les autres animaux d'élevage (Difilippo et al., 2016).

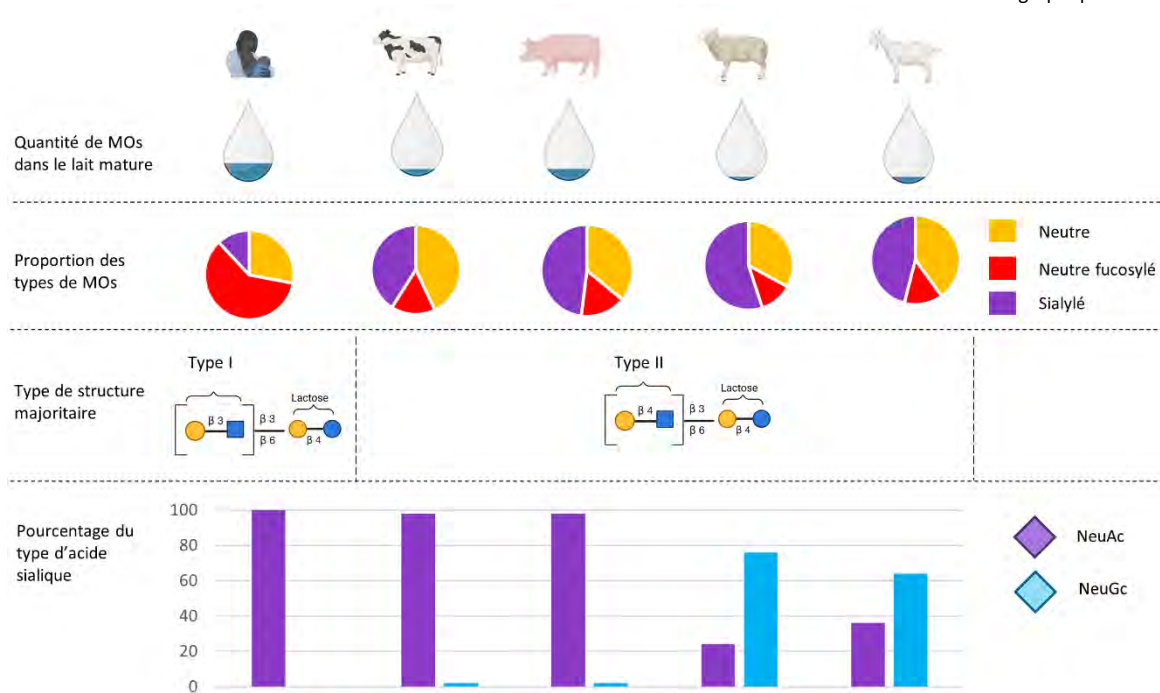


Figure 8 : Différences de composition des oligosaccharides du lait entre les laits humains, bovins, porcins, ovins et caprins. Figure créée avec Biorender, adaptée de Durham et al. (2023).

Les types de structures présentes diffèrent également entre l'humain et les animaux d'élevage. Chez l'humain, le nombre de structures possédant un corps de type I (I.C) représente 60% des MOs identifiés à ce jour (Durham et al., 2023). A l'inverse, la proportion de MOs qui possèdent un corps de type I est minime dans les laits des animaux d'élevage, ces derniers étant dominés par les structures de type II (Figure 8) (Albrecht et al., 2014). Les MOs fucosylés sont les plus abondants dans le lait humain, ainsi parmi les 183 MOs identifiés dans leur étude, Ninonuevo et al. (2006) ont identifié 77% de MOs fucosylés contre seulement 28% de MOs sialylés. A l'inverse, les MOs fucosylés sont les moins abondants dans le lait des caprins, bovins, chevaux, chèvres et ovins (Albrecht et al., 2014; Shi et al., 2021). Ainsi, les laits bovins, ovins et caprins sont dominés par des structures de MOs acides, représentant 50%, 61% et 46% des MOs totaux identifiés, respectivement (Figure 8) (Tao et al., 2009; Martín-Ortiz et al., 2017). Dans le lait équin, la proportion relative des MOs acides est également supérieure aux fucosylés, en revanche ce sont les MOs neutres qui sont majoritaires, représentant 60% des MOs totaux (Karav et al., 2018). Au sein de ces types de MOs (I.C), les profils sont également variables entre les espèces. Parmi les MOs acides, le monosaccharide NeuGc n'étant pas synthétisé chez l'homme (I.B), les MOs humains contiennent uniquement le résidu NeuAc, tandis que les laits de mammifères d'élevage contiennent également des MOs avec le résidu NeuGc, en proportion variable. Chez les bovins, chèvres et chevaux les acides sialiques sont composés à plus de 98% par le NeuAc tandis que chez les caprins et ovins 64 et 76% des MOs acides contiennent le résidu NeuGc (Figure 8) (Spichtig et al., 2010; Marino et al., 2011; Albrecht et al., 2014; Lee et al., 2016; Jin et al., 2023).

Les principaux MOs du lait sont également différents entre le lait humain et le lait des animaux d'élevage. Le 2'-FL est présent en forte concentration dans le lait humain, s'élevant à 1-2 g.L<sup>-1</sup> dans le lait mature (Samuel et al., 2019; Yao et al., 2024a), tandis qu'il est retrouvé en faible quantité dans le lait bovin, représentant moins de 1% des MOs totaux. Le 2'-FL représente toutefois 30% des MOs du lait ovin, avec une concentration rapportée comme jusqu'à 20 fois supérieure à celle observée dans le lait bovin (Yao et al., 2024a). Le 6'-sialyllactose (6'-SL (NeuAc( $\alpha$ 2-6)Gal( $\beta$ 1-4)Glc)) est également un MO fortement présent dans le lait humain, avec des concentrations allant de 0.05 à 1 mg.mL<sup>-1</sup> dans le lait mature, ce qui en fait le MO acide majoritaire (Kunz et al., 2017). A l'inverse, chez les bovins, porcins, chevaux, ovins, caprins et chèvres la concentration en 3'-sialyllactose (3'-SL (NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-4)Glc)) est supérieure à celle du 6'-SL (Albrecht et al., 2014). D'ailleurs, le 3'-SL est le MO majoritaire du lait bovin (McJarrow and van Amelsfort-Schoonbeek, 2004; Barile et al., 2010), avec des concentrations entre 50 et 100 mg.L<sup>-1</sup>, ce qui reste deux fois moins que chez l'humain (Fong et al., 2011). Les laits de chèvre, bufflone et équin, contiennent plus de 50% de 3'-SL tandis que le lait ovin en contient 30%.

A l'inverse, certaines structures non identifiées chez l'humain sont fortement représentées dans le lait des animaux d'élevage. Ils contiennent notamment des MOs dont la structure est similaire aux galactooligosaccharides (I.D) (Martinez-Ferez et al., 2006; Fukuda et al., 2010; Aldredge et al., 2013; Karav et al., 2018). Comme reporté par Urashima et al. (2013) dans leur historique sur l'analyse des MOs bovins, des structures contenant le motif LacNAc (Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc) et GalNAc( $\beta$ 1-4)Glc ont été identifiées dans le lait bovin dès 1984 (Saito et al., 1984). Puis Marino et al. (2011) ont détecté le motif LacdiNAc (GalNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc), jusqu'ici trouvé dans les glycoprotéines, sous une forme libre. Ces trois formes n'ont pas été détectées dans le lait humain. De plus, certains MOs trouvés dans les laits bovin, ovin et caprin, bien que minoritaires, contiennent le motif lactosamine (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) à la place du lactose à l'extrémité réductrice (Urashima et al., 2001; Aldredge et al., 2013). Enfin, certains MOs contiennent le monosaccharide acide glucuronique (GlcA), présent dans le lait ovin et qui s'élèverait à 10% des MOs totaux du lait bovin (Jin et al., 2023).

Les études sur le lait porcine sont moins nombreuses et certaines affichent des résultats contradictoires mais montrent tout de même une similarité plus importante du lait de cette espèce avec le lait humain que les autres animaux d'élevage cités précédemment (Figure 8, Tableau 6). La concentration de MOs dans le lait porcine mature s'élève à 6.82-6.98 g.L<sup>-1</sup> (Difilippo et al., 2016), ce qui est plus proche en terme de quantité du lait humain que les autres espèces d'élevage. Dans la plupart des études, les MOs neutres non fucosylés restent les plus abondants, suivis des acides (16-29%) (Cheng et al., 2016; Difilippo et al., 2016; Mudd et al., 2016; Salcedo et al., 2016).

Tableau 6 : Composition du lait porcin en oligosaccharides du lait selon les études disponibles à ce jour. La variabilité entre les études pourrait s'expliquer par les différences de race ou de type de lait prélevé. MOs : oligosaccharides du lait. N : neutre ; F : fucosylé ; S : sialylé.

Auteur, date	Nombre total de MOs	Abondance relative (%)			Nombre de MOs			MO majoritaire	Nombre de MOs avec NeuGc	Nombre d'individus	Type de lait	Méthode de détection
		N	F	S	N	F	S					
Difilippo et al. (2016)	34	58		49	13	6	15	3'-SL	0	2 truies	Lait mature (1 semaine de lactation)	Electrophorèse capillaire détection par fluorescence, spectrométrie de masse et chromatographie liquide
Wei et al. (2018)	47	33	9	56	16	2	29		1	10 truies et 7 cochettes	Lait mature (jour 15 de lactation)	Chromatographie liquide avec spectrométrie de masse en tandem par ionisation électro spray
Mudd et al. (2016)	60	75	4	20	31	8	21	LNnH	0	7 truies	Lait mature (jour 7 de lactation)	Chromatographie liquide nanométrique sur puce couplée à un spectromètre de masse à temps de vol et chromatographie échangeuse d'ions-
Tao et al. (2010)	29		1	60	8	6	18	SL	1	3 truies	Lait mature (jour 4-7 de lactation)	Chromatographie liquide et spectrométrie de masse
Trevisi et al. (2020)	21				8	8	7	SL	0	83 truies	Colostrum	Spectrométrie de masse par désorption laser assistée par matrice avec temps de vol
Salcedo et al. (2016)	33	51	18	31	16	4	12	3'-SL	0	3 truies	Lait mature (jour 7 de lactation)	Chromatographie liquide nanométrique sur puce avec spectrométrie de masse à quadropôle et temps de vol
Cheng et al. (2016)	41	67	3	30	11	9	24	Trisaccharide neutre	1	Inconnu	Inconnu	Chromatographie par interaction hydrophile couplée à spectrométrie de masse en tandem à quadropôle et temps de vol

La composition en MOs du lait a également été analysée sur des espèces domestiques et sauvages. Ainsi le lait des primates se rapproche de la composition du lait humain, avec une diversité plus importante que celui des animaux d'élevage, 130 structures ayant été identifiées chez le chimpanzé dont 50 % sont fucosylées. De même le ratio oligosaccharides du lait/lactose se rapproche du lait humain, allant de 1/3 à 1/5 chez les strepsirrhiniens et bonobos. En revanche les structures de type I sont rares et des résidus NeuGc ont été détectés (Urashima et al., 2009b; Tao et al., 2011; Taufik et al., 2012). Les carnivores affichent un profil en MOs particulier. La quantité d'oligosaccharides du lait des canidés étant proche ou supérieure au lactose dans le lait de la plupart des espèces, tandis que chez les félins, la quantité de lactose est supérieure aux MOs (Warren et al., 2001; Uemura et al., 2009; Senda et al., 2010).

Chez le lapin, plusieurs études ont analysé la composition du lait (Fraga et al., 1989; El-Sayiad et al., 1994; Pascual et al., 1999; Maertens L. et al., 2010), cependant elles n'indiquent pas la composition en oligosaccharides du lait.

Certaines études affichent des résultats différents pour une même espèce. Ceci peut s'expliquer par l'utilisation de méthodologies différentes pour l'analyse des MOs (Tableau 6) (van Leeuwen, 2019), mais également par plusieurs facteurs intra-espèces qui influent sur la composition du lait en MOs.

## II. Une variabilité intra-espèces

La comparaison entre 5 échantillons de lait humain montre que le nombre de MOs s'échelonne de 33 à 124 MOs dans le lait d'un individu (Ninonuevo et al., 2006). De plus, dans une revue systématique de la littérature, Thurl et al. (2017) se sont intéressés à 21 études d'analyse des MOs dans le lait humain. Ils ont obtenu la concentration de 33 structures de MOs, variant chez les individus selon plusieurs facteurs.

### A. La génétique

Comme décrit par Kobata (2017) dans l'ouvrage *Prebiotics and Probiotics in Human Milk*, dès 1967 un lien a été établi entre la composition en oligosaccharides du lait maternel, les types sanguins sécréteurs ou non sécréteurs et les antigènes du groupe sanguin Lewis. Ces points ont été fortement décrits chez l'humain tandis que les données sont absentes chez les espèces d'élevages, cette partie se concentrera donc sur le lait humain.

La présence ou l'absence des fucosyltransférases FUT2 et FUT3 (II), responsables de l'ajout d'un fucose aux MOs, est liée au génotype des gènes Sécréteurs (Se : gène *FUT2*) et Lewis (Le : gène *FUT3*), respectivement (Oriol et al., 1999). Le gène Sécréteur *FUT2* code pour l'enzyme  $\alpha$ 1-2-fucosyltransférase. Cette dernière transfère un Fuc lié en  $\alpha$ 1-2 sur le Gal d'une molécule de N-acétyllactosamine (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc) et est à l'origine de la structure Fuc( $\alpha$ 1-2)Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc présente notamment dans le 2'-FL ou le Lacto-N-fucopentaose I (LNFP I) (Fuc( $\alpha$ 1-

2)Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)Glc)) (Erney et al., 2001). L'enzyme  $\alpha$ 1-3/4 fucosyltransférase, codée par le gène Lewis *FUT3*, est à l'origine de deux motifs principaux. Le transfert d'un fucose en  $\alpha$ 1-4 sur le GlcNAc d'une molécule de lacto-N-biose (Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc) donne lieu à la formation d'un motif appelé antigène Lewis<sup>a</sup> (Gal( $\beta$ 1-3)[Fuc( $\alpha$ 1-4)]GlcNAc) comme dans le Lacto-N-fucopentaose II (LNFP II (Gal( $\beta$ 1-3)[Fuc( $\alpha$ 1-4)]GlcNAc( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)Glc)). Le transfert d'un fucose en  $\alpha$ 1-4 sur le GlcNAc d'une molécule de lacto-N-biose (Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc), déjà fucosylée en  $\alpha$ 1-2 sur le Gal via la FUT2, donne lieu à la formation d'un motif appelé antigène Lewis<sup>b</sup> (Fuc( $\alpha$ 1-2)Gal( $\beta$ 1-3)[Fuc( $\alpha$ 1-4)]GlcNAc) présent dans le Lacto-N-difucohexaose I (LNDFH I (Fuc( $\alpha$ 1-2)Gal( $\beta$ 1-3)[Fuc( $\alpha$ 1-4)]GlcNAc( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)Glc)). Le gène *FUT3* est également responsable de la liaison  $\alpha$ 1-3 d'un fucose sur le glucose de l'extrémité réductrice (Blank et al., 2012).

Certains allèles des gènes Sécréteur (*Se* > *se*) et Lewis (*Le* > *le*) sont dominants, la présence d'une seule copie de ces allèles est suffisante pour exprimer le phénotype associé (Henry et al., 1995). Les individus homozygotes (*Se/Se*) ou hétérozygotes (*Se/se*) sont appelés sécréteurs (*Se*<sup>+</sup>). Les individus homozygotes (*Le/Le*) ou hétérozygotes (*Le/le*) sont dit Lewis positifs (*Le*<sup>+</sup>).

Les interactions alléliques (épistasie) entre ces deux gènes, Lewis et Sécréteur, entraînent quatre phénotypes, également appelés lactotypes, dont les profils en MOs du lait montrent des différences importantes (Figure 9) (Thurl et al., 1997):

- Le groupe 1 correspond aux individus sécréteurs et Lewis positif. Ces individus sont dits Lewis B sécréteurs (*Le* (*a*<sup>-</sup>, *b*<sup>+</sup>), *Se*<sup>+</sup>) ; ils possèdent au moins un allèle dominant *Le* et au moins un allèle dominant *Se*, le lait de ces individus contient toutes les structures ;
- Le groupe 2 correspond aux individus non sécréteurs, Lewis positif. Ces individus sont dits Lewis A non sécréteurs (*Le* (*a*<sup>+</sup>, *b*<sup>-</sup>), *Se*<sup>-</sup>) ; ils possèdent au moins un allèle dominant *Le* et ils sont homozygotes pour l'allèle récessif *se* et ne présentent donc pas de MOs avec des résidus fucoses liés en  $\alpha$ 1-2 à l'extrémité non réductrice ;
- Le groupe 3 correspond aux individus Lewis négatifs sécréteurs (*Le* (*a*<sup>-</sup>, *b*<sup>-</sup>), *Se*<sup>+</sup>) ; ils sont homozygotes pour l'allèle récessif *le* et possèdent au moins un allèle dominant *Se* ; leurs résidus fucoses sont liés en  $\alpha$ 1-2 à l'extrémité non réductrice ;
- Le groupe 4 correspond aux individus non sécréteurs et Lewis négatifs (*Le* (*a*<sup>-</sup>, *b*<sup>-</sup>), *Se*<sup>-</sup>) ; ils sont homozygotes pour les allèles récessifs *le* et *se*. Ces derniers n'ont aucun MOs possédant un fucose lié en  $\alpha$ 1-4.

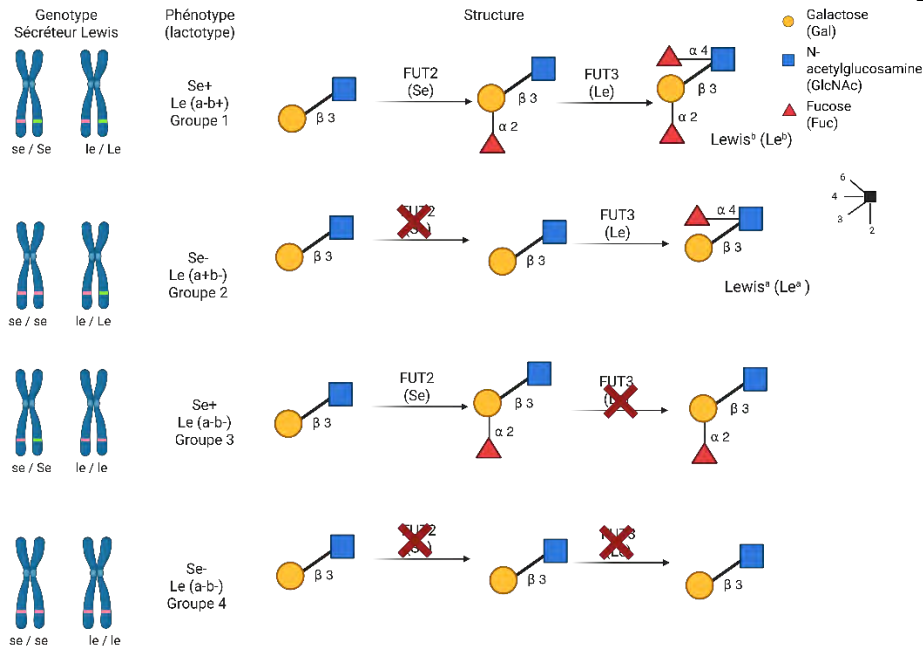


Figure 9 : Lactotypes basés sur les gènes sécréteur (*Se* ou *FUT2*) et Lewis (*Le* ou *FUT3*). Ces gènes codent pour les fucosyltransférases lorsqu'au moins un allèle dominant est présent. *Se/Le* : allèle dominant ; *se/le* : allèle récessif. Figure créée avec Biorender, adaptée de Bode (2012).

Les MOs de type I (I.C) sont les précurseurs des motifs Lewis a (Le<sup>a</sup>) et Lewis b (Le<sup>b</sup>). Lorsque les enzymes agissent sur des structures de type II, les motifs sont appelés Lewis x (Le<sup>x</sup>) et Lewis y (Le<sup>y</sup>) (Figure 10). Ainsi lorsque l'enzyme FUT3 transfère un fucose sur un N-acétyllactosamine (Gal(β1-4)GlcNAc) on obtient un motif Le<sup>x</sup> (Gal(β1-4)[Fucα1-3]GlcNAc) dans lequel le Fuc est lié au GlcNAc. Le motif Le<sup>y</sup> implique quant à lui l'enzyme FUT3 ainsi que l'enzyme FUT2 (Fuc(α1-2)Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc) (Smith and Cummings, 2017; Garádi et al., 2025).

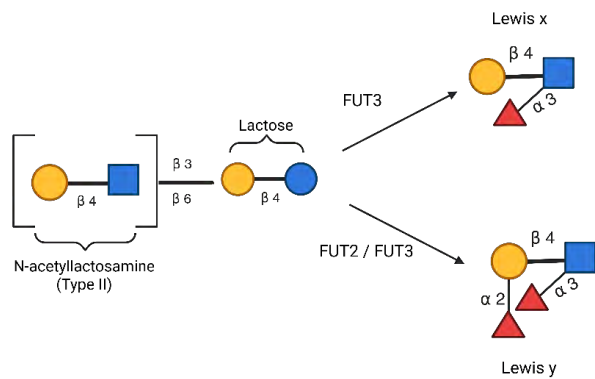


Figure 10 : Motifs Lewis x et Lewis y basés sur l'expression des enzymes *FUT2* et *FUT3* sur des MOs de type II.

Les individus du groupe sécréteur sont majoritaires dans la population. Les chiffres varient selon les études mais ils représenteraient 80% de la population contre 15% d'individus non sécréteurs et 5% de Lewis négatifs (Urashima et al., 2014; Samuel et al., 2019; Fan et al., 2023).

La concentration et la diversité de MOs sont plus élevées chez les mères sécrétrices ((Le(a<sup>-</sup>, b<sup>+</sup>), Se<sup>+</sup>) ou (Le(a<sup>-</sup>, b<sup>-</sup>), Se<sup>+</sup>)), en particulier en raison de la présence du 2'-FL, absent chez les mères non-sécrétrices ((Le(a<sup>+</sup>, b<sup>-</sup>), Se<sup>-</sup>) ou (Le(a<sup>-</sup>, b<sup>-</sup>), Se<sup>-</sup>)) et représentant jusqu'à 40 % des MOs

chez les mères sécrétrices (Azad et al., 2018; Selma-Royo et al., 2022; Fan et al., 2023) (Figure 11). Les profils de fucosylation varient selon le lactotype. Les lactotypes Le(a<sup>-</sup>, b<sup>+</sup>), Se<sup>+</sup> et Le(a<sup>-</sup>, b<sup>-</sup>), Se<sup>+</sup> présentent les plus fortes concentrations en MOs  $\alpha$ 1-2-fucosylés (FUT2-dépendants). Les lactotypes Le(a<sup>-</sup>, b<sup>+</sup>), Se<sup>+</sup> et Le(a<sup>+</sup>, b<sup>-</sup>), Se<sup>-</sup> montrent une abondance élevée de MOs  $\alpha$ 1-4-fucosylés impliquant FUT3. Enfin, le lactotype Le(a<sup>+</sup>, b<sup>-</sup>), Se<sup>-</sup> est caractérisé par une majorité de MOs  $\alpha$ 1-3-fucosylés, produits uniquement par la FUT3 (Thurl et al., 2010; Totten et al., 2012).

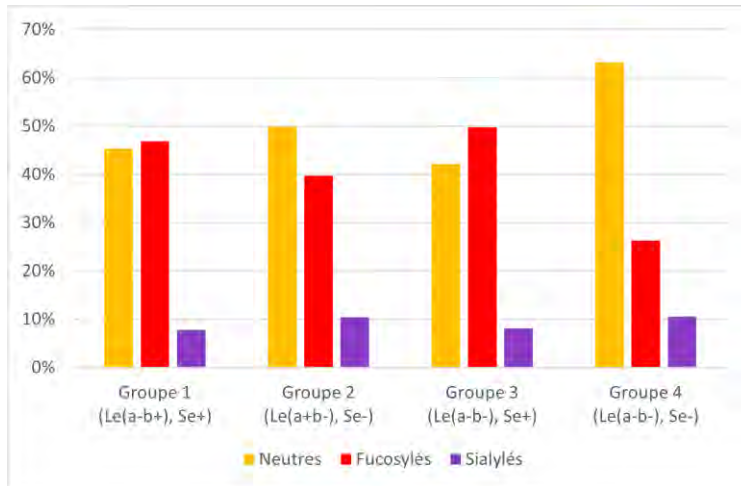


Figure 11 : Pourcentage de chaque type d'oligosaccharide du lait selon le lactotype de la mère. Adaptée de Totten et al. (2012).

Cependant, chez les mères Lewis négatives, des MOs avec des résidus fucose liés en  $\alpha$ 1-3 ont été détectés (Thurl et al., 1997). Il semblerait que les mères Lewis négatives puissent synthétiser des MOs possédant un résidu fucose lié en  $\alpha$ 1-3 en raison de l'activité d'une fucosyltransférase indépendante des gènes Lewis (van Leeuwen et al., 2018). Ainsi, l'effet de la génétique sur les profils en MOs n'est pas totalement compris, et ces effets de la génétique sont d'ailleurs encore méconnus chez les mammifères non humains.

#### B. Race des animaux

Les profils de composition en MOs varient significativement selon la race, comme cela a été démontré dans plusieurs espèces animales. Puisqu'aucune étude ne s'est intéressée à la composition en MOs du lapin, il n'existe à ce jour pas de comparaison entre les races cunicoles. En revanche, chez le porc, certaines études indiquent une moindre diversité en MOs dans le colostrum de la race Landrace par rapport aux Duroc ou Large White (Trevisi et al., 2020), bien que d'autres n'aient pas détecté de différences significatives dans le lait mature (Cheng et al., 2016).

Chez les bovins, les races Jersiaise et Holstein présentent des profils différents, avec une concentration plus élevée en MOs acides et fucosylés dans le lait des Jersiaises (McJarrow and van Amelsfort-Schoonbeek, 2004; Sundekilde et al., 2012; Kelly et al., 2013; Robinson et al., 2019). Chez la chèvre, les races Guanzhong et Garnica présentent des niveaux plus élevés des MOs acides 3'-SL et 6'-SL que les Saanen ou Maltaises (Claps et al., 2014; Lu et al., 2020). Chez

le chien, la race Schnauzer produit davantage de 2'-FL que le Labrador ou l'Alaskan husky, certaines structures fucosylées étant même spécifiques à certaines races (Macias Rostami et al., 2014). Enfin, chez le cheval, la concentration totale en MOs varie fortement entre races telles que Shetland, Arabe-New forest, Frison, ou sang chaud hollandais (Difilippo et al., 2015).

Ces résultats soulignent une variabilité entre races importante, dont l'origine est encore indéterminée à ce jour.

### C. Géographie

Certaines études ont montré des différences importantes selon la localisation des échantillons de lait prélevés. Chez l'homme, une première différence existe dans la proportion des différents lactotypes (II.A). Aux Etats-Unis, en Europe, en Suisse et en Finlande, la proportion de mères sécrétrices est élevée allant de 79% à 95% tandis que dans les pays d'Afrique, d'Asie Centrale et du Pacifique, la part de mères sécrétrices est plus faible avec des valeurs pouvant être de 64 voire 57% (Figure 12) (McGuire et al., 2017; Vinjamuri et al., 2022).

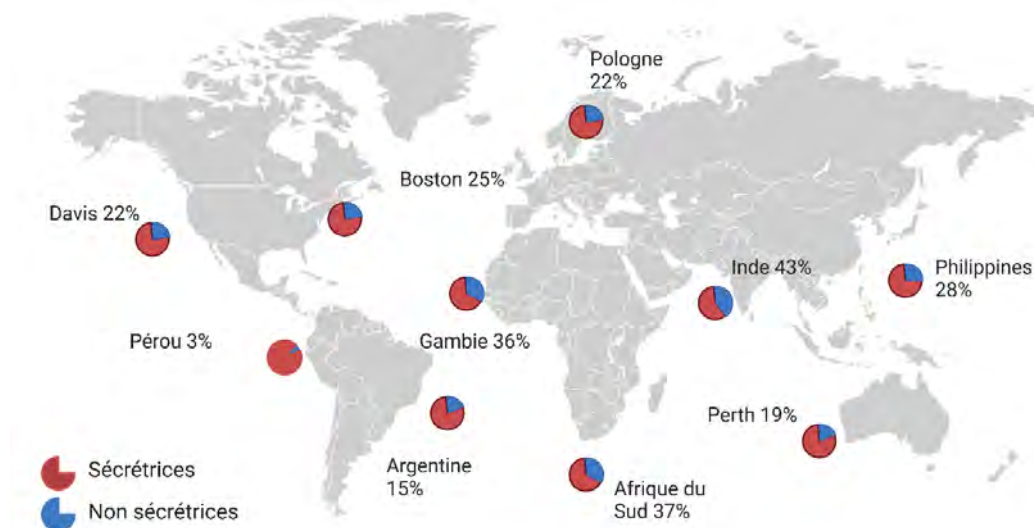


Figure 12 : Proportion des phénotypes Sécrétrices / non Sécrétrices selon la géographie. Les pourcentages indiquent les proportions de mères non sécrétrices. Figure créée avec Biorender, adaptée de McGuire et al. (2017) et Vinjamuri et al. (2022).

L'étude de McGuire et al. (2017) qui compare le lait des mères vivants en Suède, Espagne, Pérou, Amérique du Nord, Ethiopie, Gambie, Ghana et Kenya a montré d'importantes différences dans les profils de MOs. La concentration en 3-FL ( $\text{Gal}(\beta 1-4)[\text{Fuc}(\alpha 1-3)]\text{Glc}$ ) dans le lait des mères vivant en Suède est 4 fois plus élevée que dans celui des mères vivant en Gambie tandis que le disialyllacto-N-tetraose (DSLNT ( $\text{NeuAc}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-3)[\text{NeuAc}(\alpha 2-6)]\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$ ) est plus élevé dans le lait de ces dernières. Globalement le lait produit par des femmes vivant en Suisse et en Californie est plus riche en MOs fucosylés que le lait des individus vivant dans les autres pays de l'étude mais moins riche en MOs sialylés. Le lait des mères vivant au Pérou est le plus riche en MOs de petite taille tels que les trisaccharides, contenant trois monosaccharides. (McGuire et al., 2017). Au sein même d'un

pays des différences ont été constatées entre des zones urbaines et rurales. En Gambie, les concentrations de LNT et DSLNT sont plus élevées dans le lait des mères vivant dans les zones rurales. En Ethiopie, les concentrations de 6'-SL et sialyllacto-N-tetraose c (LSTc (NeuAc( $\alpha$ 2-6)Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)Glc)) sont plus élevées dans le lait des mères vivant en zones urbaines de même que le taux de MOs sialylés (McGuire et al., 2017).

Ces effets de la géographie pourraient être liés à la saisonnalité. Plusieurs études suggèrent une influence de la saison et des conditions environnementales sur la composition en MOs, bien qu'il reste difficile de distinguer l'effet de la saison de celui de la période de lactation. Chez l'humain, des variations saisonnières de concentration en MOs ont été observées en Gambie, en Finlande et en Chine, souvent associées à l'apport énergétique différent selon la période de l'année ou aux conditions climatiques (Davis et al., 2017; Zhang et al., 2022; Matharu et al., 2024). D'autres travaux ont également rapporté une association entre la végétalisation de l'environnement et la diversité des MOs dans le lait, suggérant un lien possible avec le mode de vie des mères (activité physique, stress) (Lahdenperä et al., 2023). Chez la vache, des études menées en Australie et en Nouvelle-Zélande ont montré des variations des MOs au cours de la lactation, mais l'effet de la saisonnalité reste difficile à isoler du cycle naturel de lactation, car les vêlages étaient synchronisés (McJarow and van Amelsfort-Schoonbeek, 2004; Liu et al., 2017). A l'inverse, chez le porc, Trevisi et al. (2020) n'ont pas trouvé d'effets de la saison sur la composition en MOs des individus.

### III. Une variabilité intra-individu

Au sein d'une espèce, plusieurs facteurs sont responsables de variations de profils en MOs pour un individu donné.

#### A. Stade de lactation

Dans toutes les espèces étudiées, le colostrum est systématiquement plus riche en MOs que le lait mature, en terme de concentration globale (Nakamura et al., 2003; Martinez-Ferez et al., 2006; Urashima et al., 2009a; Difilippo et al., 2016; Karav et al., 2018). Chez l'humain, le colostrum contient en moyenne 22-24 g.L<sup>-1</sup> de MOs contre 12-13 g.L<sup>-1</sup> dans le lait mature (Urashima et al., 2009a). De même, chez le bovin, la concentration en MOs s'élève à 1 g.L<sup>-1</sup> dans le colostrum et 200 mg.L<sup>-1</sup> dans le lait mature (Nakamura et al., 2003). Martinez-Ferez et al. (2006) ont mesuré des concentrations de 2.4 g.L<sup>-1</sup> dans le colostrum caprin contre 250 à 300 mg.L<sup>-1</sup> de MOs dans le lait mature. Enfin, le colostrum porcin contient environ 12 g.L<sup>-1</sup> de MOs contre 6 g.L<sup>-1</sup> dans le lait mature, des valeurs plus faibles que chez l'humain mais plus élevées que dans les autres animaux d'élevage (Difilippo et al., 2016).

Au-delà de cette diminution quantitative globale, des variations spécifiques par types de MOs sont observées au cours de la lactation. Chez l'humain, si la concentration totale diminue, certains MOs augmentent en concentration, c'est le cas de DSLNT, 3'-SL, 3-FL ou encore sialyllacto-N-tetraose b (LSTb (Gal( $\beta$ 1-3)[NeuAc( $\alpha$ 2-6)]GlcNAc( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)Glc)), qui

présentent une dynamique croissante au cours des premières semaines ou mois post-partum (Thurl et al., 2010; Azad et al., 2018; Samuel et al., 2019; Li et al., 2022c). A l'inverse, de nombreux MOs diminuent, parmi les acides (6'-SL, sialyllacto-N-tetraose a (LSTa (NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)Glc)), LSTc), les fucosylés (2'-FL, LNFP I, LNFP II, Difucosyl-lacto-N-hexaose I (DF-LNH I) (Fuc( $\alpha$ 1-2)Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc( $\beta$ 1-3)[Gal( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-3)]GlcNAc( $\beta$ 1-6)]Gal( $\beta$ 1-4)Glc)) et les neutres (LNH, LNT et LNnT), certains n'étant même plus détectés après quelques semaines (Coppa et al., 1999; Thurl et al., 2017; Azad et al., 2018; Zhang et al., 2022).

Des tendances comparables sont observées chez les animaux d'élevage, bien que la variabilité interspécifique soit plus marquée. Une tendance générale est la diminution progressive des MOs sialylés au cours de la lactation. Chez la vache, le 3'-SL passe de 0.9 g.L-1 dans le colostrum à 0.09 g.L-1 dès 3 jours après le vêlage (Nakamura et al., 2003; Tao et al., 2009). Les concentrations de 3'-SL, 6'-SL et 6'- N-acetyl-neuraminyl-lactosamine (6'-SLN (NeuAc( $\alpha$ 2-6)Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc)) diminuent entre la première et la cinquième traite (McJarrow and van Amelsfort-Schoonbeek, 2004), tout comme la proportion de MOs contenant un résidu NeuGc entre le colostrum et le 6ème jour de lactation (Tao et al., 2009). Des observations similaires sont faites chez le porc, où les MOs acides représentent 80 % du total au moment de la mise bas, mais seulement 40 % après 3 à 4 semaines de lactation. Cette diminution s'accompagne d'une augmentation relative des MOs fucosylés entre le colostrum (jour 1), le lait de transition (jour 3) et le lait mature (jour 6) (Mudd et al., 2016; Salcedo et al., 2016; Wei et al., 2018). Chez la chèvre, toutes les structures diminuent en concentration au cours de la lactation sauf 3'-N-glycolylneuraminyl-lactose (3'-NGL (NeuGc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-4)Glc)) (Chatziioannou et al., 2021), tandis que la part relative des MOs contenant NeuGc ou un groupement fucosylé augmente (Martín-Ortiz et al., 2017).

En résumé, bien que la richesse du colostrum en MOs soit un caractère partagé entre espèces, la dynamique d'évolution des différents types de MOs (acides, fucosylés, neutres) au cours de la lactation varie sensiblement d'une espèce à l'autre. Une tendance généralisable est la diminution des MOs acides, particulièrement marquée dans les laits bovins, porcins et caprins. Enfin, les données comparent généralement le colostrum, dont la durée de ce type de lait varie selon les espèces, et le lait mature mais peu de données de comparaison sont disponibles en cinétique sur la période de lactation.

#### B. Rang de parité

Le rang de parité indique le nombre de fois où l'individu a donné naissance. Les primipares n'ont donné naissance qu'une fois contrairement aux multipares qui ont mis bas à plusieurs reprises. Les études sur l'impact du rang de parité sont peu nombreuses mais semblent montrer quelques corrélations entre ce facteur et la composition en MOs.

La parité influence significativement la concentration de certains MOs, avec des teneurs en 3'-SL, 6'-SL et LNT plus élevées chez les vaches en deuxième parturition comparées aux

primipares (Robinson et al., 2019), des variations de 3'-galactosyllactose (3'-GL (Gal( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)Glc)) et 6'-galactosyllactose (6'-GL (Gal( $\beta$ 1-6)Gal( $\beta$ 1-4)Glc)) observées dans le lait caprin selon le rang de parité (Gonzalez-Prendes et al., 2024), et une concentration en 3'-SL plus élevée en deuxième qu'en troisième parité dans le lait caprin (Claps et al., 2016). Le lait des truies primipares et multipares présente un nombre de structures semblables dans le colostrum (54 et 55 respectivement). Les truies primipares présentent cependant une diminution du nombre de MOs plus importante au cours de la lactation que les truies multipares (48 contre 53 dans le lait transitionnel et 41 contre 47 dans le lait mature). Les MOs les plus impactés sont les sialylés, puisque leur nombre est toujours inférieur dans le lait des primipares tandis que le nombre de MOs fucosylés et neutres sont semblables (Wei et al., 2018). Toutefois, Trevisi et al. (2020) n'ont trouvé aucun effet de la parité sur la composition en MOs du colostrum porcin. Chez l'homme également, une corrélation entre la parité et certains MOs a été trouvée. Ainsi les femmes multipares possèdent une concentration plus élevée de LNnT et LNT tandis que le 3-FL et le 3'-SL sont plus faibles dans le lait de ces dernières par rapport aux primipares (Azad et al., 2018; Matharu et al., 2024). En revanche, Samuel et al. (2019) ont constaté un taux significativement plus élevé de LNnT dans le lait des mères primipares. Les mères primipares avaient également significativement plus de DSLNT mais moins de 6'-GL, 3-FL, LNFP II et lacto-N-fucopentaose V (LNFP V(Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-3)]Glc)) par rapport aux primipares.

### C. Alimentation

L'alimentation de la mère pourrait affecter la composition en MOs du lait. Ainsi une corrélation négative a été identifiée entre le taux de protéines ingérées et le MO LSTb (Azad et al., 2018). Un changement alimentaire de seulement huit jours peut fortement influencer la composition en MOs, comme l'ont montré Seferovic et al. (2020), un régime riche en graisses entraîne une légère diminution des MOs sialylés par rapport à un régime riche en glucose, tandis qu'un régime riche en glucose réduit légèrement la concentration en MOs fucosylés par rapport à un régime riche en galactose. L'impact des fibres a également été étudié. Dans une cohorte de 70 mères résidant au Mexique, les individus consommant plus de fibres possèdent une concentration en MOs plus élevée (Urrutia-Baca et al., 2024). En revanche, la plus faible ingestion de fibres insolubles (cellulose, hémicellulose et polyphénols) entraînerait une plus grande concentration de MOs total. Dans cette étude les polyphénols étaient positivement associés aux isomères DFLNH, FLNH et disialyllacto-N-hexaose (DSLNH) tandis que le fructose et le galactose étaient positivement associés au 2'-FL mais négativement associés au 3-FL (Selma-Royo et al., 2022). Les vitamines et ions métalliques ont également montré des effets sur la composition du lait en MOs. Les vitamines A, C, B1 et B2 sont associées à une concentration élevée en MOs fucosylés (Li et al., 2022d). Une plus grande ingestion de vitamine A est également associée avec de plus fortes concentrations en LSTa et LSTc (Qiao et

al., 2013; Biddulph et al., 2023). Cet effet des vitamines s'expliquerait par leur rôle de coenzymes (Mokhtari et al., 2024).

Certaines études se sont également concentrées sur l'effet d'un aliment en particulier. Ainsi, une consommation élevée de fromage est liée à une plus forte concentration en 2'-FL et sialyllacto-N-neohexaose II (S-LNnH II (Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)[Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)]Gal(β1-4)Glc)), tandis que la consommation d'œufs augmente l'abondance en LNT et LNnT, et la consommation de poisson est négativement associée à l'abondance de Lacto-N-difucohexaose I (LNDFH I (Fuc(α1-2)Gal(β1-3)[(Fucα1-4)]GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc)) dans une cohorte de 392 mères (Fan et al., 2023). En revanche il est difficile d'analyser les effets d'un aliment en particulier et de nombreuses études n'ont, au contraire, trouvé aucune corrélation entre la quantité d'énergie ingérée quotidiennement, les types de régimes alimentaires (végétarien, végane) ou encore la supplémentation en lipides et les MOs (Jorgensen et al., 2017; Azad et al., 2018; Neville et al., 2022).

Les nombreuses études décrites ci-dessus illustrent donc la grande diversité des MOs. Au vu des nombreux facteurs qui influent sur la composition en MOs, l'espèce, la génétique, la race, la géographie, le stade de lactation, le rang de parité et l'alimentation, il s'avère complexe de faire un état de l'art de ces variations. Certaines limites existent dans la comparaison entre les données qualitatives et quantitatives des MOs, les techniques d'extraction et d'analyse des MOs influençant grandement sur les structures identifiées. De plus, il est difficile d'étudier l'effet d'un facteur en particulier puisque ces derniers interagissent entre eux et les résultats entre études sont difficilement comparables puisque plusieurs facteurs interviennent. Par exemple dans les études impliquant les animaux d'élevage, l'alimentation et le logement des animaux varient entre études. De même, d'autres facteurs s'ajoutent à ceux décrits précédemment tels que l'âge et l'état de la santé de la mère. Certains auteurs ont développé des bases de données visant à répertorier le plus grand nombre d'analyses des MOs dans le lait des mammifères (Remoroza et al., 2020; Durham et al., 2023; Jin et al., 2023). Cependant, vu l'intérêt majeur de ce sujet la réalisation d'une veille incluant des métadonnées associées aux femelles et à leur environnement est nécessaire pour décrire, comprendre et maîtriser les sources de variations. De plus, l'analyse globale de ces données pourrait contribuer à mieux comprendre le lien entre diversité et fonctionnalité des MOs en relation avec les besoins spécifiques des nouveau-nés, notamment en termes de développement de la barrière épithéliale

## Chapitre 3 Fonctions des oligosaccharides du lait

---

La plupart des MOs échappent à la digestion par l'hôte et parviennent intacts dans la partie distale du tube digestif, où ils agissent sur la barrière intestinale (Goehring et al., 2014). Cette barrière repose sur une organisation en plusieurs niveaux complémentaires : (i) une composante physique, qui régule l'adhésion bactérienne et le passage des composés de la lumière intestinale vers les tissus, (ii) une composante chimique à l'origine de substances antimicrobiennes et (iii) une composante immunitaire, chargée de distinguer les pathogènes des microorganismes commensaux. Elle comprend, de la lumière vers l'intérieur, le microbiote intestinal, l'épithélium intestinal recouvert d'une couche de mucus partiellement colonisée par le microbiote et la *lamina propria*, constituée de nombreuses cellules impliquées dans la réponse immunitaire (Viggiano et al., 2015).

### I. La muqueuse digestive, une barrière contre les agressions externes

La fonction principale du tractus gastro-intestinal est la digestion des aliments ingérés et l'absorption des nutriments issus de cette dernière (Vancamelbeke and Vermeire, 2017). L'épithélium est constitué d'une monocouche de plusieurs types cellulaires jointifs et structurellement organisés en cryptes permettant d'augmenter la surface d'absorption des aliments, cette fonction ne sera toutefois pas détaillée dans les paragraphes suivants. La deuxième fonction du tractus gastro-intestinal est la fonction barrière, la muqueuse intestinale est continuellement exposée aux antigènes des composés ingérés et du microbiote entérique. Une réponse équilibrée aux challenges antigéniques est donc nécessaire pour éviter la pénétration des pathogènes et toxines à travers la muqueuse intestinale, tout en favorisant l'absorption sélective des nutriments essentiels. Pour cela, la muqueuse intestinale joue un rôle de protection semiperméable par des barrières physiques, chimiques, immunitaires et microbiennes (Fiocchi, 2008).

#### A. Barrières physiques et chimiques

La muqueuse intestinale permet une première protection du tube digestif et se décompose en trois couches structurelles successives : l'épithélium, en contact avec la lumière intestinale ; la *lamina propria*, un tissu conjonctif constitué de leucocytes, fibroblastes, cellules musculaires et vasculaires impliqués dans les défenses immunitaires ; et la muqueuse musculaire, mince couche de muscle lisse (Newberry and Gustafsson, 2016).

Les cellules épithéliales constituent une barrière physique jointive. L'espace paracellulaire entre les entérocytes est clos par des complexes de jonctions (Figure 13): les desmosomes, les jonctions adhérentes et les jonctions serrées (Groschwitz and Hogan, 2009). Ces jonctions entre les cellules régulent le passage des macromolécules mais permettent tout de même un transport passif paracellulaire des petites molécules hydrophiles, ions et eau. Les cellules épithéliales sont issues des cellules souches pluripotentes situées au fond des cryptes et se

distinguent en 5 types : les entérocytes, des cellules absorbantes responsables de l'absorption des nutriments, les cellules caliciformes ou en gobelet qui sécrètent du mucus, les cellules entéroendocrines qui sécrètent des hormones, les cellules de Paneth qui produisent des peptides et les lymphocytes intra épithéliaux, cellules immunitaires insérées dans l'épithélium (Yao et al., 2024b).

Les cellules caliciformes sécrètent une couche de glycocalyx, revêtement constitué par des glycoprotéines et protéoglycanes, et du mucus (Figure 13), qui empêchent le contact direct des bactéries avec les cellules épithéliales (Camilleri et al., 2012). Le mucus est composé d'eau, d'électrolytes, de lipides et de protéines hautement glycosylées (50 à 80% d'oligosaccharides conjugués) (Bansil and Turner, 2018). Certains monosaccharides entrant dans la composition des oligosaccharides du mucus sont communs à ceux des oligosaccharides du lait : le galactose (Gal), le N-acétylglucosamine (GlcNAc), le fucose (Fuc) et l'acide N-acétylneuraminique (NeuAc) (Bansil and Turner, 2018). Le mucus fournit donc une niche pour les bactéries bénéfiques, notamment par les adhésines, protéines de liaison spécifiques des glucides présentes à la surface des bactéries qui leur permettent de se lier aux glycans des mucines. Le mucus représente également une source d'énergie pour les bactéries possédant des enzymes catalysant la dégradation des glycoprotéines. A l'inverse, le mucus est également un piège pour les pathogènes, les empêchant de parvenir aux cellules épithéliales (Tailford et al., 2015). Cette barrière physique, composée du mucus et des cellules épithéliales, n'est pas figée mais constitue une structure dynamique, qui répond aux stimuli internes (cytokines ...) et externes (bactéries, facteurs alimentaires ...) (Vancamelbeke and Vermeire, 2017).

A ces barrières physiques s'ajoutent des barrières chimiques, constituées de substances bactériolytiques ou bactériostatiques ainsi que de facteurs antimicrobiens tels que les défensines et les cathélicidines qui ciblent les parois cellulaires des bactéries (Figure 13). Ces composés sont sécrétés par les cellules de Paneth et peuvent se trouver capturés dans le mucus (Kelsall, 2008). Les peptides antimicrobiens exercent leurs effets en ciblant la structure des parois cellulaires des bactéries. Ils ont une action sélective, avec un large spectre d'activités antimicrobiennes (Yao et al., 2024b). L'absence de cellules de Paneth dans le gros intestin entraîne une prédominance des barrières physiques dans la défense de la muqueuse, le mucus, mais également une protéine hautement glycosylée ancrée à la surface de la muqueuse du gros intestin, Lypd8 (Fu et al., 2011; Pham et al., 2014).

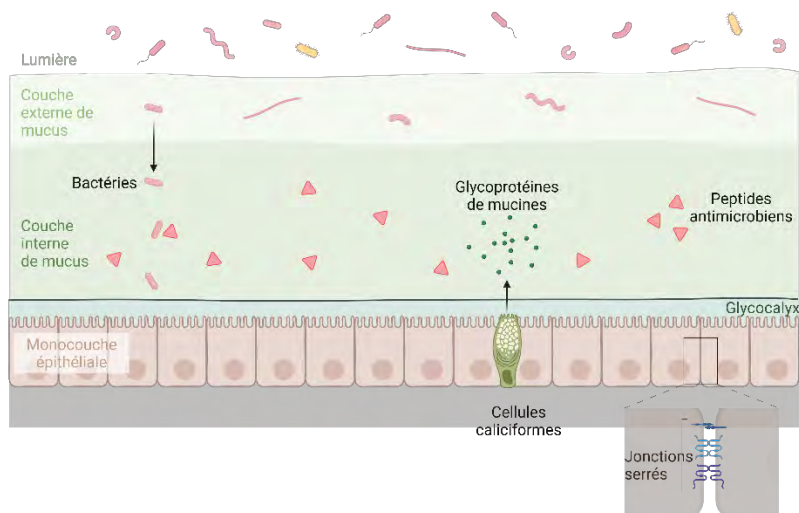


Figure 13 : Barrières physiques et chimiques de la muqueuse intestinale du colon. Figure créée avec Biorender, adaptée de Hooper, Macpherson (2010)

Les cellules épithéliales sont également impliquées dans l'initiation de la réponse immunitaire. Elles possèdent à leur surface des récepteurs de reconnaissance de pathogènes (PRRs pour pattern recognition receptors) capables d'identifier des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs pour pathogen associated molecular patterns) présents à la surface des microorganismes. L'interaction entre les PRRs et les PAMPs entraîne l'activation de voies de signalisation pour la sécrétion de cytokines et chimiokines visant à déclencher une réponse moléculaire contre les pathogènes (Lebeer et al., 2010).

## B. Le GALT

Le système immunitaire est distribué dans l'ensemble du corps, fournissant une défense contre les pathogènes. A l'instar de nombreuses muqueuses de l'organisme, la muqueuse intestinale est associée à un tissu lymphoïde appelé GALT (Gut associated lymphoid tissue) qui constitue la part la plus importante de tissus lymphoïdes du corps.

### 1. Les cellules de l'immunité

Les cellules immunitaires dérivent de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes présentes dans la moelle osseuse qui se différencient en progéniteurs myéloïdes ou lymphoïdes. L'immunité innée est la première ligne de défense, représentée par des cellules non spécifiques dont le mode d'action est similaire quels que soient les pathogènes. Les cellules de l'immunité innée sont issues de la lignée myéloïde de la moelle osseuse qu'ils quittent pour rejoindre les tissus de l'organisme par le sang. On retrouve des granulocytes, à savoir les neutrophiles, éosinophiles et basophiles, mais également les monocytes, qui se différencient en macrophages à leur arrivée dans les tissus, les mastocytes et les cellules dendritiques (King et al., 2003). Les cellules de l'immunité innée possèdent également des PRRs tels que les récepteurs Toll like (TLRs pour toll like receptors), les domaines d'oligomérisation de liaison aux nucléotides (NLRs pour nod like receptors), les molécules

d'adhésion et les lectines (Lebeer et al., 2010). Après reconnaissance, les cellules vont intégrer les antigènes, les transformer en peptides immunogènes et les présenter aux cellules de l'immunité adaptative, par le biais d'un complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II (CMH I et II). Les cellules responsables de cette présentation sont appelées cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (King et al., 2003).

La réponse immunitaire adaptative repose sur des lymphocytes issus de la lignée lymphoïde de la moelle osseuse qui mûrissent dans des organes lymphoïdes primaires (le thymus pour les lymphocytes T et la moelle osseuse pour les lymphocytes B mais également l'appendice vermiforme chez le lapin) où, lors de la lymphopoïèse, ils synthétisent des récepteurs et marqueurs de surface spécifiques d'un antigène unique, les récepteurs de cellules T (TCRs pour T-cell receptors) et de cellules B (BCRs pour B-cell receptors). Ces récepteurs sont composés d'une région constante et d'une région variable, encodée par des segments de gènes qui subissent un réarrangement somatique des segments permettant d'encoder des sites de liaisons aux antigènes spécifiques (Chaplin, 2010). Ainsi, à partir d'un nombre limité de gènes il est possible d'obtenir un grand nombre de récepteurs (Janeway, 2001). Après maturation, les lymphocytes migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où ils sont stimulés et prolifèrent suite à l'interaction de leurs récepteurs avec les antigènes cibles. Dans la réponse immunitaire adaptative on distingue deux types de réponse. Une réponse à médiation humorale qui est assurée par les lymphocytes B, qui, après reconnaissance des pathogènes extracellulaires, se différencient en plasmocytes. Ces derniers produisent des anticorps (immunoglobulines) capables de se lier aux antigènes spécifiques pour les neutraliser, facilitant ainsi leur reconnaissance par les cellules phagocytaires. Le deuxième type de réponse est à médiation cellulaire, accomplie par les lymphocytes T, qui, après activation, se multiplient et synthétisent des facteurs bioactifs (Janeway, 2001).

Certaines cellules issues de la lignée lymphoïde ont un rôle dans l'immunité innée, telles que les cellules lymphoïdes innées (ILCs pour innate lymphoid cells) et les cellules natural killer (NK). Ces dernières ne présentent pas de spécificités d'antigènes à la différence des LT et LB. Les ILCs résident dans les tissus périphériques notamment la *lamina propria* intestinale, et sont médiateurs de réponses inflammatoires. On distingue trois types d'ILCs. Les ILC1, activés par les cytokines IL-12 et IL-18, sécrètent IFN $\gamma$  afin de participer à la protection contre les virus et les pathogènes intracellulaires. Les ILC2 sont induits par IL-33 notamment, et produisent les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13. Ils promeuvent l'immunité muqueuse et participent à la protection contre les parasites. Enfin, les ILC3 sont induits par les cytokines IL-1 $\beta$  et IL-23 et participent à la protection contre les bactéries extracellulaires et les champignons en produisant les cytokines IL-17 et IL-22. Les cellules NK, quant à elles, sont impliquées dans la reconnaissance et la destruction rapide des cellules infectées par un virus ou des cellules tumorales. On retrouve les cellules NK dans le sang périphérique mais également dans certains tissus sous forme de NK résidentes. Lorsque les cellules NK sont activées, elles peuvent libérer

des substances cytotoxiques afin d'induire la mort des cellules cibles ou sécréter des cytokines comme IFN $\gamma$  afin d'activer d'autres cellules immunitaires (Murphy and Weaver, 2016).

Les cellules immunitaires possèdent à leur surface des marqueurs de différenciation (CD pour cluster de différenciation) qui dépendent de leur état d'activation et de leurs fonctions. Par exemple, les cellules dendritiques matures expriment à leur surface les molécules de costimulation CD80 et CD86, essentielles à l'activation des lymphocytes T, mais absentes des cellules dendritiques immatures (Chaplin, 2010). De même, les lymphocytes T se distinguent par deux grands types de marqueurs de différenciation, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> qui sont dit cytotoxiques, leur rôle est d'éliminer les cellules considérées étrangères tandis que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ont une activité régulatrice (King et al., 2003).

## 2. Les structures de l'immunité

Au sein du GALT, les cellules immunitaires se situent tout le long de la muqueuse intestinale et sont distribuées en structures organisées, comme les ganglions mésentériques lymphoïdes et les plaques de Peyer, ou diffuses dans l'épithélium et la *lamina propria* (Fiocchi, 2008).

Le GALT est divisé en deux compartiments. Les sites inducteurs sont des agrégats lymphoïdes organisés localisés dans la paroi de l'intestin grêle et du gros intestin, tels que les plaques de Peyer, exclusivement dans l'intestin grêle, et les follicules lymphoïdes isolés. Ils sont responsables de la phase d'induction de la réponse immunitaire par reconnaissance des agents étrangers. Insérées dans l'épithélium, les plaques de Peyer forment des structures en dômes qui s'étendent jusqu'à la lumière de l'intestin (Wittig and Zeitz, 2003). Les cellules M, des entérocytes spécialisés, forment une monocouche de cellules épithéliales, l'épithélium associé aux follicules (FAE pour follicle-associated epithelium), sous laquelle se trouve une zone plus diffuse, le dôme sous épithélial, riche en cellules dendritiques (Mowat, 2003). Sous le dôme sous épithélial se trouvent des follicules centraux de lymphocytes B et des zones périfolliculaires de lymphocytes T. Les follicules centraux contiennent un centre germinal proche du dôme sous épithélial, lieu majeur de génération des anticorps intestinaux par les plasmocytes, entouré d'une zone de lymphocytes B naïfs, elle-même entourée d'une zone marginale avec des lymphocytes B mémoires. Au sein de ces centres germinatifs, des populations spécifiques de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, appelées lymphocytes T auxiliaires folliculaires (TfH), sont spécialisées dans l'interaction avec les lymphocytes B. Ces lymphocytes TfH sont particulièrement présents dans les plaques de Peyer, les follicules lymphoïdes isolés et les ganglions mésentériques. Les zones périfolliculaires contiennent des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires, des lymphocytes T régulateurs FOXP3<sup>+</sup> et des cellules T helper (Mörbe et al., 2021).

Chez le porc les plaques de Peyer sont présentes dans l'iléon, sous la forme d'une unique plaque large, et dans le jéjunum, au nombre de 20 à 30 (Pabst et al., 1988). Chez le lapin, on trouve plusieurs plaques de Peyer dans le jéjunum et l'iléon dont environ 50% des cellules

épithéliales du FAE sont des cellules M contre 5 à 10% chez l'humain (Arrazuria et al., 2018). Absentes du gros intestin, les plaques de Peyer sont remplacées par des follicules lymphoïdes isolés, également présents dans le petit intestin. Ces derniers sont également des sites inducteurs de l'immunité et possèdent une organisation similaire aux plaques de Peyer, avec des cellules M et un dôme sous épithélial riche en cellules dendritiques ainsi qu'un follicule central de lymphocytes B entourés de lymphocytes T (Mörbe et al., 2021). Le lapin possède également deux segments supplémentaires différenciés en tissus lymphoïdes organisés, le *sacculus rotundus* situé à l'extrémité terminale de l'intestin grêle et l'appendice vermiforme située à l'extrémité du caecum et appartenant aux organes lymphoïdes primaires (Figure 14). A eux deux ils représentent plus de 50% des tissus lymphoïdes du corps (Arrazuria et al., 2018). A l'inverse, l'appendice n'est pas retrouvée dans le tractus gastrointestinal du porc (Figure 14) (Burkey et al., 2009).

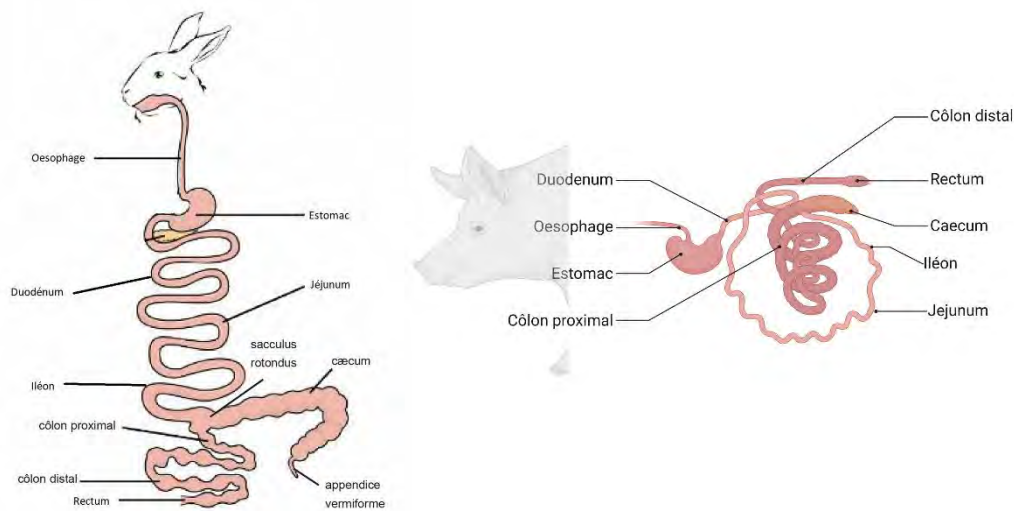


Figure 14 : Tractus digestif du lapin et du porc. Le lapin possède deux segments spécifiques non retrouvés chez le porc, le *sacculus rotundus* et l'appendice vermiforme. Figure créée avec Biorender, adaptée de Paës et al. (2023).

Les sites effecteurs de l'immunité, où a lieu l'élimination de l'agent indésirable, sont diffus au sein de la *lamina propria* et de l'épithélium (Figure 15). La *lamina propria* est hautement vascularisée, contenant des vaisseaux sanguins et lymphatiques, permettant la communication avec les autres tissus et le transport des cellules de l'immunité (Wagner et al., 2022). La *lamina propria* intestinale, principal compartiment de l'immunité digestive, dont les proportions de cellules immunitaires de l'organisme humain sont débattues mais seraient de l'ordre de 70% (MacDonald, 2008), présente une grande diversité de types de cellules de l'immunité. On y retrouve notamment des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules lymphoïdes avec des lymphocytes B et T (Wittig and Zeitz, 2003). Les lymphocytes T sont principalement de type CD4<sup>+</sup>, essentiels dans la régulation immunitaire locale mais on retrouve également environ 40% de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques. La plupart des lymphocytes T de la *lamina propria* expriment des cluster de différenciation (CDs) signes d'une

précédente activation (CD45RO<sup>+</sup>, CD62, CD69, CD25<sup>+</sup>) (Newberry and Gustafsson, 2016). Enfin, quelques lymphocytes B matures sont présents (Mowat, 2003).

### 3. La réponse immunitaire

Aux sites inducteurs a lieu un échantillonnage permanent des antigènes de la lumière par les cellules M et les cellules dendritiques (Abraham and Cho, 2009). Les cellules M, spécialisées dans le transport des antigènes, possèdent des microplis à leur surface leur permettant d'échantillonner les antigènes et de les présenter aux cellules dendritiques du dôme sous-jacent (Figure 15). Ces dernières possèdent des PRRs à leur surface leur permettant d'échantillonner l'antigène et de générer des peptides immunogènes. Les cellules dendritiques peuvent également transporter directement l'antigène en étendant leurs dendrites entre les cellules épithéliales pour atteindre la lumière intestinale (Burkey et al., 2009). Les cellules dendritiques migrent alors dans les régions riches en lymphocytes T naïfs, tels que les ganglions lymphatiques mésentériques, les follicules ou la *lamina propria*, pour présenter le peptide immunogène aux lymphocytes T spécifiques de l'antigène présenté, et initier une réponse immunitaire adaptative (Neurath et al., 2002). Ce mécanisme leur vaut la dénomination de cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) (King et al., 2003).

Après activation, les lymphocytes B et T activés migrent pour atteindre les systèmes lymphatiques abdominal et thoracique, pour rejoindre *in fine* les sites effecteurs de la réponse immunitaire. Cette migration des lymphocytes est appelée adressage (Mannick and Udall, 1996).

Selon les conditions inflammatoires, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés vont développer un phénotype spécifique, helper ou régulateur (Figure 15). Les lymphocytes T helper (Th) réalisent une réponse pro-inflammatoire, dont on distingue trois principaux phénotypes, Th1, Th2 et Th17. Les lymphocytes Th1 induisent une réponse cytotoxique et inflammatoire par la production de cytokines Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et Interleukine -12 (IL-12) entraînant une réaction à médiation cellulaire. Les lymphocytes Th2 produisent les cytokines IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 et ont un rôle de soutien dans la différenciation des lymphocytes B en cellules plasmiques sécrétrices d'IgA. Enfin, les lymphocytes Th17 produisent des IL-17, IL-21 et IL-22 et protègent contre les bactéries extracellulaires (Smith and Garrett, 2011). En général, les cytokines de type Th1 et Th2 sont inhibitrices mutuelles, une réponse fortement orientée vers le type Th2 va donc inhiber les réponses de type Th1 et inversement. Les lymphocytes T régulateurs réduisent l'inflammation en sécrétant des cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 et Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Maynard and Weaver, 2008), réduisant la réponse T helper (Ashley et al., 2012). D'autres cellules Th sont également présentes, telles que les Th9, induites par les cytokines TGF $\beta$  et IL-4. Ces Th9 produisent notamment la cytokine IL-9 et sont impliqués dans l'immunité antiparasitaire et l'inflammation allergique. De même, les lymphocytes Th22 sont induits par

les cytokines IL-6 et TNF $\alpha$  et produisent la cytokine IL-22 afin de protéger l'épithélium et favoriser la cicatrisation (Murphy and Weaver, 2016).

Les lymphocytes B activés se transforment en plasmocytes, à l'origine de la production d'anticorps appelés immunoglobulines. Les plasmocytes de la *lamina propria* produisent des Immunoglobulines A (IgA) dimériques, qui se lient à des récepteurs polymériques d'immunoglobulines présents à la surface basale des cellules épithéliales intestinales (Figure 15). Le complexe, formé par l'IgA et une portion du récepteur, appelée pièce sécrétoire, est transporté sous forme d'IgA sécrétoire (sIgA) par endocytose et transcytose vers la lumière où il se fixe aux composés de la surface bactérienne et empêche l'adhésion et l'entrée des antigènes dans l'épithélium (King et al., 2003). La pièce sécrétoire permet de stabiliser l'anticorps et le protège de la protéolyse (Phalipon et al., 2002).

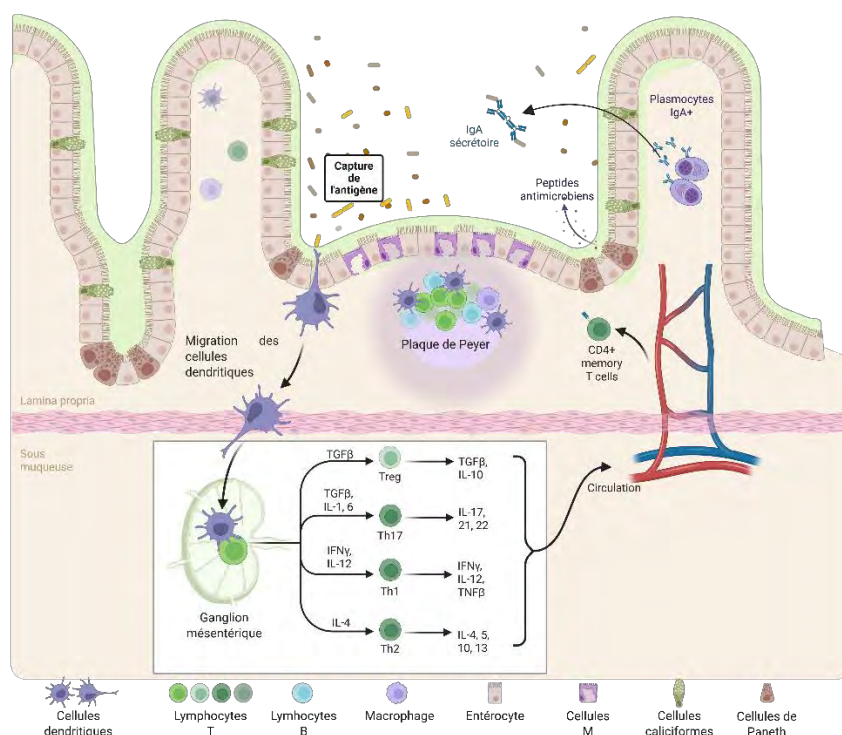


Figure 15 : Représentation schématique du tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (GALT). Les plaques de Peyer sont recouvertes du FAE (épithélium associé aux follicules) qui permet un échantillonnage des antigènes de la lumière. Après capture de l'antigène, les cellules dendritiques migrent vers les ganglions mésentériques pour activer les lymphocytes T vers un phénotype spécifique. Ces lymphocytes activés se rendent dans la lamina propria intestinale où a lieu la réponse immunitaire effectrice. Les lymphocytes B activés se transforment en plasmocytes et produisent des IgA, transportés vers la lumière intestinale sous forme d'IgA sécrétoires. Figure créée avec Biorender, adaptée de Abraham, Cho (2009).

### C. Le microbiote intestinal

Le tractus gastro-intestinal, à l'instar des autres surfaces de l'organisme en contact direct avec l'environnement extérieur, héberge une part importante de microorganismes, présents à la surface de la muqueuse intestinale. L'hôte a développé une relation mutualiste avec le microbiote, fournissant une niche environnementale aux microorganismes tandis que ces derniers contribuent à diverses fonctions physiologiques dont celles allant d'une protection

physique de l'épithélium à un rôle immunitaire en passant par une barrière chimique (Takiishi et al., 2017).

### 1. L'intestin, un environnement riche en microorganismes

Les bactéries représentent la population majoritaire du microbiote des mammifères (Gill et al., 2006). La composition bactérienne est dynamique et dépend des caractéristiques physicochimiques de l'intestin, telles que le pH et la concentration en oxygène, de la disponibilité des substrats ou encore du type de barrière existante. L'ensemble du tractus digestif est colonisé par des microorganismes mais des variations longitudinales sont observables, la concentration étant plus élevée dans les segments distaux du tube digestif. Ainsi, chez le porc on retrouve  $10^{11-12}$  bactéries/g dans le colon, principal site de fermentation microbienne chez le porc, contre  $10^4$  bactéries/g dans le duodénum (Pluske et al., 2002). Le lapin est le mammifère possédant le caecum le plus développé. Il représente ainsi 40 à 60% du volume total du tractus gastrointestinal, ce qui en fait le principal site de fermentation microbienne (Davies and Rees Davies, 2003). On y retrouve ainsi une grande proportion de microorganismes, avec  $10^{12}$  bactéries/g dans le caecum contre  $10^8$  bactéries/g dans l'iléon (Combes et al., 2011).

### 2. Le rôle du microbiote dans la protection de la muqueuse

#### i. Exclusion compétitive des pathogènes

Le tractus gastrointestinal représente une niche écologique pour les espèces bactériennes, leur permettant de coloniser et de proliférer. La notion d'exclusion compétitive indique qu'une espèce bactérienne rivalise avec d'autres pour l'adhésion à l'épithélium intestinal et la consommation des ressources nutritives (Kamada et al., 2013). Ce phénomène repose sur divers mécanismes d'action.

Les pathogènes et les commensaux sont en compétition pour les mêmes nutriments, comme les souches d'*E. coli* non pathogènes avec *E. coli* entérohémorragique (EHEC). En consommant les nutriments limitants les souches d'*E. coli* non pathogènes empêchent le développement des souches pathogènes (Momose et al., 2008). Certaines bactéries ont développé des mécanismes pour dégrader des nutriments clés présents dans l'intestin. Ainsi, *Bacteroides thetaiotaomicron* produit des fucosidases, enzymes catabolisant le clivage du fucose présent sur certaines glycoprotéines de la mucine (Xu et al., 2003). L'utilisation des nutriments disponibles résulte en l'accumulation ou la production de métabolites pouvant agir contre les pathogènes. Le fucose libéré par l'hydrolyse des carbohydrates fucosylés par *Bacteroides thetaiotaomicron* module l'expression des gènes de virulence des EHEC (Pacheco et al., 2012). De plus les métabolites, peuvent modifier les conditions environnementales, les rendant moins optimales au développement des pathogènes. La production d'acides gras à chaînes courtes diminue ainsi le pH (Shin et al., 2002), tandis que la consommation de l'oxygène résiduel par les bactéries commensales anaérobies facultatives limite l'expression de facteurs

de virulence de certains pathogènes (Marteyn et al., 2010). Enfin, certaines bactéries produisent des substances antimicrobiennes qui inhibent directement le développement des pathogènes. C'est le cas de certaines souches d'*E. coli* qui inhibent les souches pathogènes *E. coli* O157:H7 entérohémorragique par production de colicines, une bactériocines avec des activités antibactériennes (Schamberger and Diez-Gonzalez, 2002).

Le microbiote peut également agir indirectement sur la colonisation des pathogènes en régulant les mécanismes de défense développés par l'hôte, que ce soit la barrière épithéliale ou la réponse immunitaire.

#### ii. Effets directs du microbiote sur la barrière intestinale

Les motifs bactériens PAMPs, notamment les peptidoglycanes, lipoprotéines et lipopolysaccharides, sont reconnus par les récepteurs PRRs des cellules épithéliales, ce qui entraîne l'activation de voies de signalisation impliquées dans les rôles de barrières physiques et chimiques (Li and Wu, 2021). Ainsi, les peptidoglycanes microbiens peuvent être reconnus par les récepteurs NOD2 (Nucleotide-binding oligomerization domain) et TLR2 (Toll-like receptor 2) des cellules de Paneth induisant, entre autres, la production de cytokines, la régénération de l'épithélium et la production de peptides antimicrobiens (Nigro et al., 2014). D'ailleurs, les souris déficientes en protéines de reconnaissance des motifs microbiens NOD2 présentent une altération dans leur fonction de barrière épithéliale et une moindre production de peptides antimicrobiens (Kobayashi et al., 2005). De même, chez les souris axéniques, dont le tube digestif est stérile, la production de mucus, initialement déséquilibrée et fine, s'épaissit après l'administration de composants de la paroi bactérienne, tels que le LPS et le peptidoglycane (Petersson et al., 2011).

En plus de moduler la barrière mucosale, le microbiote a des effets immunomodulateurs et permettrait notamment d'équilibrer les réponses pro- et anti-inflammatoires. Le microbiote influence tout d'abord les structures immunitaires et le nombre de cellules. Les souris axéniques ont un GALT sous développé par rapport aux souris conventionnelles, avec des plaques de Peyer et des ganglions mésentériques réduits (Macpherson and Harris, 2004) ainsi qu'un nombre de lymphocytes T régulateurs diminué dans la *lamina propria* du colon (Round et al., 2011). Les bactéries influencent également les fonctions immunitaires. Certaines espèces de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* peuvent réduire l'inflammation intestinale en augmentant la production de cytokines anti-inflammatoires, telles qu'IL-10, par les cellules dendritiques (Hart, 2004). Ces effets immunomodulateurs peuvent également provenir de certains composants de la paroi bactérienne. Mazmanian et al. (2005) ont ainsi montré qu'un polysaccharide de *Bacteroides fragilis*, internalisé par les cellules dendritiques et présenté aux lymphocytes T, induirait l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et le rééquilibrage des réponses Th1/Th2, fonction absente lors de l'utilisation d'un mutant de *B. fragilis* dépourvu de ce polysaccharide. Ce même polysaccharide favoriserait la différenciation des lymphocytes T

CD4<sup>+</sup> en lymphocytes T régulateurs FOXP3<sup>+</sup> et la production d'IL-10 anti-inflammatoire (Round and Mazmanian, 2010).

### iii. Effets indirects via des métabolites bactériens

Les métabolites bactériens ont également un rôle modulateur des barrières physiques. Les effets des métabolites sur la barrière intestinale ont principalement été étudiés dans des cellules épithéliales humaines, murines et porcines, les études chez le lapin sont quant à elles limitées. Le traitement d'organoïdes caecaux de lapin avec le contenu caecal de lapereaux sevrés modulerait l'expression des peptides antimicrobiens et des récepteurs TLRs, signe de la maturation de la barrière épithéliale (Beaumont et al., 2020). Les acides gras à chaînes courtes (AGCCs), butyrate, propionate et acétate, produits par les fermentations bactériennes ont montré des effets sur la barrière intestinale, agissant notamment en se fixant sur les récepteurs couplés aux protéines G (GPR), présents à la surface des cellules épithéliales et immunitaires (Wu et al., 2012). Le butyrate, issu de la fermentation des fibres alimentaires et glucides indigestibles, est responsable de la différenciation des entérocytes et augmente la production de mucine (Zheng et al., 2017; Nielsen et al., 2018). Dans des organoïdes de jéjunum de porcelet traités avec le déoxynivalénol (DON), une mycotoxine alimentaire, le butyrate a permis de pallier partiellement aux effets délétères du DON sur la perméabilité cellulaire et de renforcer les jonctions serrées épithéliales (Alberge et al., 2024). Le butyrate module également la réponse immunitaire en inhibant l'histone désacétylase (HDAC), enzyme qui coupe le groupe acetyl d'un résidu lysine des histones de l'acide désoxyribonucléique (ADN) inactivant certaines voies de production de cytokines pro-inflammatoires (Singh et al., 2010; Chang et al., 2014), des macrophages et cellules dendritiques. Cette stimulation des cellules dendritiques a pour effet d'augmenter la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en lymphocytes T régulateurs FOXP3<sup>+</sup> comme montré *in vitro* (Arpaia et al., 2013). De plus, le butyrate peut réduire la réponse inflammatoire en inhibant la voie NF-κB des macrophages de la *lamina propria* chez l'homme (Lührs et al., 2002). La supplémentation en butyrate chez des porcelets sevrés à 30 jours atteints de colite induite par l'administration de LPS, a ainsi permis de réduire le taux de cytokines pro-inflammatoires IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-8 et IL-12 dans le colon (Han et al., 2020).

L'acétate favorise la différenciation des cellules caliciformes du colon, augmentant de fait la production de mucus, comme montré par l'étude de Wrzosek et al. (2013) dans des lignées cellulaires HT-29, productrice de mucus. Le traitement de lignées cellulaires épithéliales porcines IPEC-J2 avec de l'acétate augmente la viabilité cellulaire, l'expression de protéines de jonctions serrées et réduit l'expression de TNF-α et NF-κB (Salari et al., 2022). L'analyse *in vitro* de coculture de cellules épithéliales et de cellules mononuclées du sang périphériques (PBMCs pour Peripheral Blood Mononuclear Cells) porcines stimulées avec du LPS a montré que la supplémentation en acétate permet d'augmenter la synthèse des protéines de jonctions serrées et de diminuer l'expression de NF-κB (Andrani et al., 2023).

La supplémentation en propionate dans des cocultures de cellules épithéliales et de PBMCs *in vitro* permettrait également de renforcer la barrière épithéliale et de réduire l'inflammation (Andrani et al., 2023). Ces résultats ont également été observés *in vivo* avec une augmentation des protéines de jonction serrées dans la muqueuse du jéjunum de porc perfusé avec du propionate (Zhang et al., 2019b). Enfin, le traitement de lignée cellulaire d'entérocytes humains Caco-2, stimulées avec TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ , avec les acides gras à chaînes ramifiées (BCFAs pour Branched Chain Fatty Acids) isovalérate et isobutyrate, a permis de réduire la perméabilité intestinale (Boudry et al., 2013). La supplémentation de rats atteints d'entérocolite nécrosante (NEC pour necrotizing enterocolitis) avec des BCFAs permettrait de réduire l'incidence de la NEC tout en augmentant l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Ran-Ressler et al., 2013). Il convient toutefois de noter que le rôle des BCFAs est encore peu connu, et qu'ils ont également montré des effets délétères en augmentant l'inflammation et endommageant la barrière intestinale dans des modèles de Caco-2 (Pieper et al., 2016).

#### D. Les mécanismes de développement de la barrière intestinale

La naissance et le sevrage (développé dans le Chapitre 4 Utilisation des oligosaccharides du lait pour promouvoir la santé) constituent deux périodes majeures d'exposition à de nouveaux antigènes chez le nouveau-né. Stérile *in utero*, la muqueuse intestinale est exposée à des antigènes microbiens à la naissance alors même que les barrières physiques, chimiques et immunitaires sont en cours de développement.

##### 1. Maturation immunitaire de l'hôte

A la naissance les barrières physiques et chimiques de la muqueuse intestinale (I.A) du nouveau-né n'ont pas atteint leur stade de développement final. Chez la souris, les cryptes intestinales se développent aux alentours de 10 à 12 jours après la naissance, en même temps que les cellules souches, les entérocytes et les cellules endocrines. Les cellules caliciformes sont présentes à la naissance, mais leur capacité de sécrétion reste très réduite durant les premiers jours de vie (Wagner et al., 2022). De plus, les entérocytes immatures ont une capacité d'endocytose plus élevée, le transfert d'antigènes à travers la barrière épithéliale est donc augmenté (Weström et al., 2020). Parallèlement, le système immunitaire, qui se forme chez l'embryon et se développe au cours de la vie fœtale, n'a pas atteint sa maturité après la naissance, le nouveau-né est donc particulièrement vulnérable. Ainsi, la proportion de cellules CD45<sup>+</sup>, marqueur des cellules hématopoïétiques, augmente drastiquement dans les 2 jours suivant la naissance dans l'intestin grêle murin (Figure 16) (Torow et al., 2015).

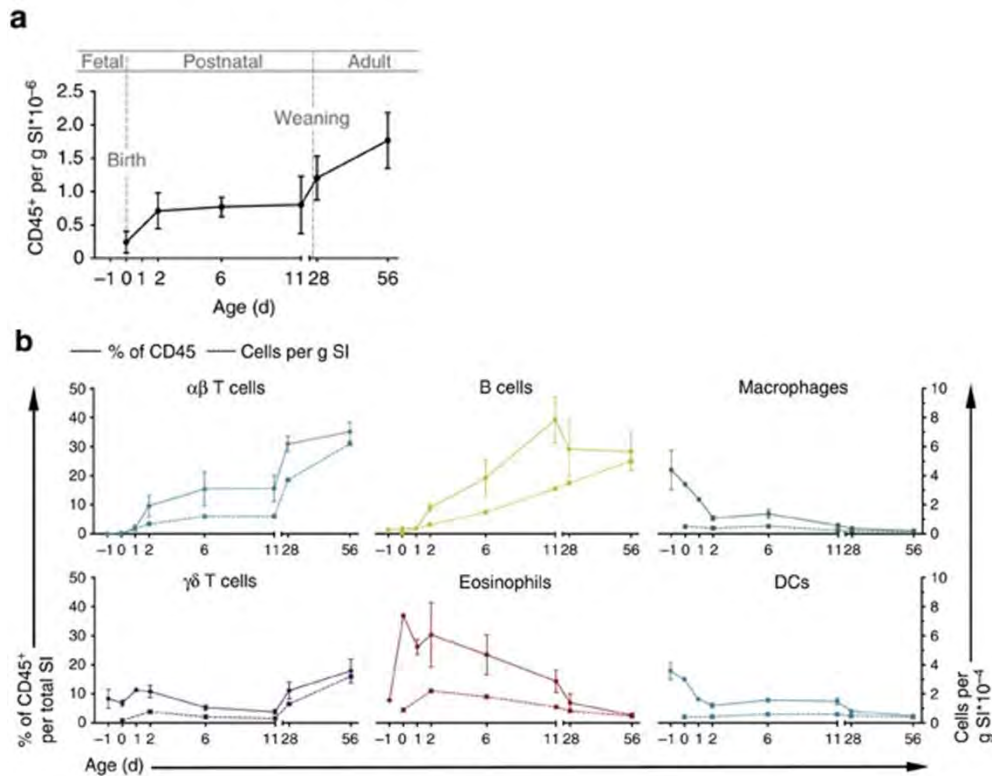


Figure 16 : Cinétique d'évolution de la composition en cellules immunitaires dans l'intestin grêle murin au cours des 56 premiers jours de vie. (a) Nombre absolu de cellules CD45<sup>+</sup> par gramme d'intestin grêle en fonction de l'âge. (b) Sous-ensembles de cellules immunitaires présents dans l'intestin grêle en fonction du temps exprimés en pourcentage de cellules CD45<sup>+</sup> (trait plein) et nombre absolu par g de tissu (trait discontinu). Les macrophages, cellules dendritiques (DCs), éosinophiles et lymphocytes  $\gamma\delta$  sont présents à la naissance et leur quantité reste stable tandis que les lymphocytes B et  $T\alpha\beta$  sont les principaux contributeurs à l'augmentation du nombre de CD45<sup>+</sup>. D'après Torow et al. (2015).

L'absorption de lait confère une protection temporaire au nourrisson contre les infections par le biais du transfert d'anticorps maternels (Bandrick et al., 2014). Cette immunité passive est critique, en particulier pour les espèces dont le transfert de macromolécules est empêché durant la gestation en raison du type de placentation, comme c'est le cas chez la truie. En effet, les truies possèdent un placenta épithéliochoriale diffus, le rendant imperméable au transfert d'anticorps et de macromolécules maternelles (Šinkora and Butler, 2009). Le colostrum de truie, riche en immunoglobulines G (IgG) et lymphocytes, est donc indispensable pour la transmission d'anticorps maternels (Figure 17). Ces composés peuvent pénétrer les cellules épithéliales intestinales grâce aux récepteurs FcRn (neonatal fragment crystallizable receptor) des cellules épithéliales, protéines impliquées dans le transport et la protection des IgG, pour se rendre dans les vaisseaux lymphatiques et les ganglions lymphatiques mésentériques. A l'inverse, la placentation hémochoriale des lapines permet un transfert d'immunoglobulines au cours de la gestation, si bien que le lapereau possède déjà des IgG à la naissance. Chez cette espèce, le colostrum et le lait ne présentent que peu de différences dans leur composition (Borghesi et al., 2014). La quantité d'immunoglobulines transmises par l'immunité passive est cependant diminuée après les premiers jours de vie, simultanément à la mise en place du système immunitaire du nouveau-né (Figure 17).

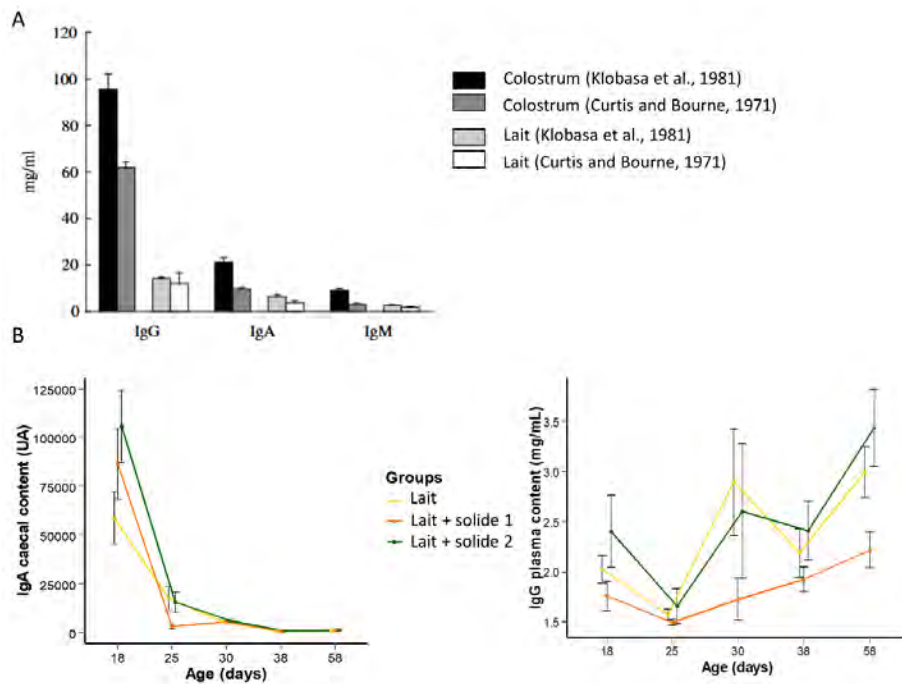


Figure 17 : Concentration en (A) IgG, IgA et IgM dans le colostrum et le lait de truie d'après Dividich et al. (2005), données issues de Klobasa et al. (1981) et Curtis and Bourne (1971) (B) IgA dans le contenu caecal et IgG dans le plasma de lapereaux en fonction de l'âge et du régime alimentaire. D'après Paës et al. (2022).

*In utero*, les premières cellules de l'immunité innée apparaissent parallèlement à l'activation de l'hématopoïèse dans les organes lymphoïdes primaires. Les progéniteurs des lymphocytes B et lymphocytes T apparaissent respectivement dans la moelle osseuse et le thymus, où ils commencent à exprimer leurs récepteurs et marqueurs de surface (Šinkora and Butler, 2009). Ainsi, au même titre que la souris, les porcelets et lapereaux naissent avec un système immunitaire en cours de développement, qui va connaître une période d'expansion et de spécialisation dans les premières semaines de vie. A la naissance, les organes lymphoïdes secondaires sont encore en cours de développement, les premiers follicules lymphoïdes se formant entre la naissance et 6 semaines d'âge chez le porc (Bailey et al., 2001), et dès 2 semaines d'âge jusqu'à 5 à 6 semaines d'âge chez le lapin (Knight and Winstead, 1997). Le nombre de cellules hématopoïétiques (marqueur de surface CD45<sup>+</sup>) intestinales augmente après la naissance. Les cellules myéloïdes sont présentes à la naissance, en revanche les lymphocytes T et B ne commencent à peupler les organes lymphoïdes secondaires qu'après la naissance et conservent un phénotype naïf jusqu'à 2 à 4 semaines. Ainsi chez le porc, entre la naissance et 2 semaines d'âges, les premiers lymphocytes T colonisent les plaques de Peyer mais ils n'expriment pas les antigènes de surface CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> (Figure 18) (Vega-López et al., 1995). La *lamina propria*, dont le nombre de leucocytes est minime à la naissance, est peuplée selon plusieurs étapes distinctes. Les cellules dendritiques apparaissent dès la première semaine de vie tandis que les lymphocytes T CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> augmentent entre la première semaine et 10 jours d'âge. Chez le porc, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> migrent des organes lymphoïdes primaires vers la *lamina propria* intestinale entre la deuxième et la troisième d'âge, tandis que

les CD8<sup>+</sup> n'y parviennent qu'à partir de la quatrième semaine (Figure 18) (Bianchi et al., 1992; Bailey et al., 2001).

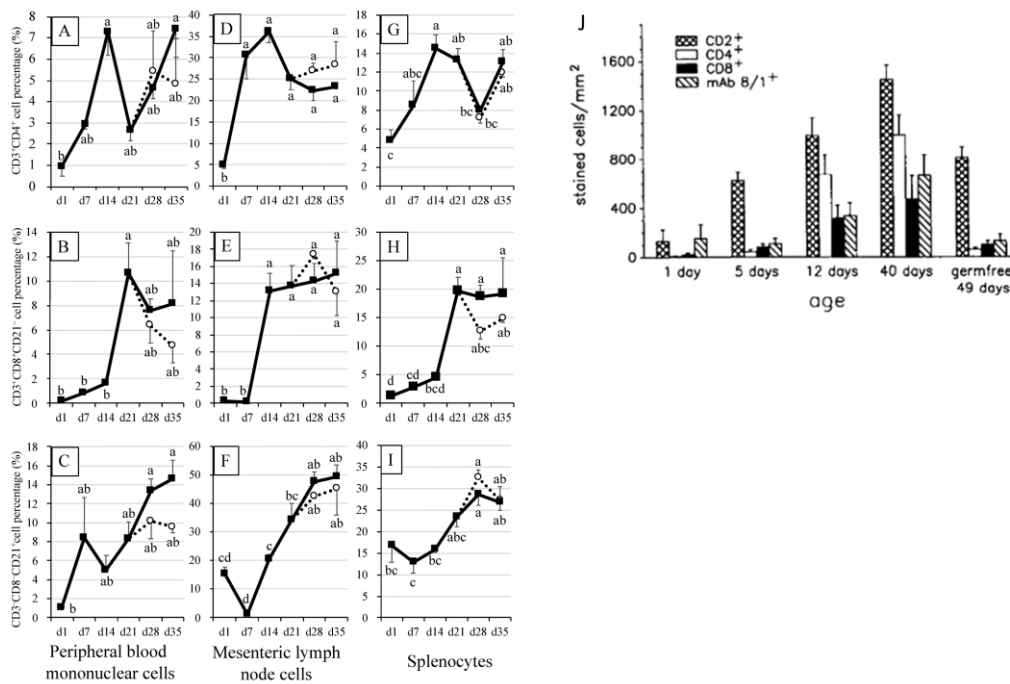


Figure 18 : Proportion des (A) (D) (G) lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, (B) (E) (H) lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et (C) (F) (I) lymphocytes B au cours du temps dans différents compartiments chez le porcelet. La part de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et lymphocytes B augmente au début de la vie dans tous les compartiments. A l'inverse, la part de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> n'augmente qu'à partir de 14 jours d'âge. (J) nombre des lymphocytes T dans la lamina propria de porc en fonction du temps. D'après Harayama et al. (2022).

De même chez le lapin, la proportion de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est plus élevée dans les premiers jours de vie puis le taux de CD8<sup>+</sup> augmente dans le sang périphérique, la rate et les ganglions lymphatiques, diminuant le ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (Figure 19) (Jeklova et al., 2007). Les données spécifiques sur la cinétique d'installation des cellules immunitaires dans la lamina propria ne sont toutefois pas disponibles chez le lapin.

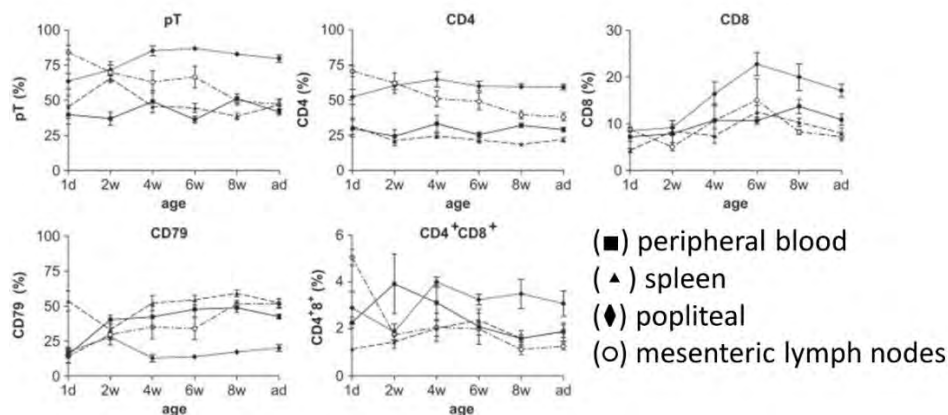


Figure 19 : Proportion des lymphocytes totaux (pT), lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, lymphocytes B (CD79<sup>+</sup>) et lymphocytes T immatures double positifs (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) chez le lapin. La part de lymphocytes T est réduite dans le sang périphérique et la rate par rapport aux ganglions lymphatiques tandis que les lymphocytes B dominent dans la rate. La part de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> augmente significativement avec l'âge, jusqu'à 6 semaines dans les ganglions mésentériques. D'après Jeklova et al. (2007).

Il existe cependant une différence notable dans la constitution du répertoire d'anticorps entre le porc et le lapin. Les récepteurs des lymphocytes sont composés d'une région variable, encodée par des segments de gènes qui subissent un réarrangement somatique permettant d'encoder des sites de liaison spécifiques aux antigènes (Chaplin, 2010). Chez le porc, la lymphopoïèse et le réarrangement des gènes ont lieu dans la moelle osseuse tout au long de la vie (Sinkora and Sinkorova, 2014). A l'inverse, chez le lapin, les réarrangements ont lieu dans l'appendice vermiforme et le *sacculus rotundus*, considérés comme des organes lymphoïdes primaires. La majorité des réarrangements ont déjà eu lieu à 6-8 semaines d'âge chez le lapin et la génération de nouveaux lymphocytes B (lymphopoïèse) chez l'adulte est limitée (Parra et al., 2013).

Enfin, chez la plupart des mammifères nouveau-nés, les lymphocytes T helper sont majoritairement orientés vers une réponse de type Th2, ciblant les bactéries extracellulaires, au détriment d'une réponse de type Th1, dirigée contre les cellules infectées par des pathogènes intracellulaires (Tizard, 2023). Ils favorisent ainsi une immunité humorale au détriment d'une réponse cellulaire. Ce déséquilibre pourrait résulter d'un phénomène d'immunosuppression *in utero*, persistant après la naissance (Raghupathy, 1997). Chez l'homme, une autre hypothèse explicative repose sur le concept hygiéniste, selon lequel la réduction de l'exposition aux microorganismes en début de vie, dans les pays développés, limiterait la stimulation des voies immunitaires impliquées dans l'activation des réponses Th1 (Yazdanbakhsh et al., 2002).

## 2. Développement du microbiote de l'hôte

Chez le porc et le lapin, comme dans toutes les espèces, la colonisation débute à la naissance par un microbiote peu diverse mais très variable entre individus avant de parvenir à un microbiote stable (Kovács et al., 2006; Frese et al., 2015; Read et al., 2019).

Les premières sources pour la colonisation par le microbiote sont maternelles et environnementales. Les premières espèces à coloniser l'iléon des porcelets sont des bactéries anaérobies facultatives, *E. coli* et *Streptococcus spp.*, qui consomment l'oxygène présent et permettent la mise en place d'un environnement anaérobique, favorable aux autres bactéries. A 2 jours d'âge, des espèces de *Lactobacilli* sont détectées dans l'iléon et persistent jusqu'à 19 jours d'âge (Konstantinov et al., 2006). Chez des porcelets sevrés de 28 jours les *Pseudomonadota*, anciennement *Proteobacteria*, dominent le duodénum et le jéjunum tandis que le colon, où le nombre de bactéries est supérieur avec  $10^{11-12}$  bactéries/g, est dominé par les *Bacteroidota*, anciennement *Bacteroidetes*, et les *Bacillota*, anciennement *Firmicutes*. Ces différences sont attribuables aux variations physicochimiques et à la disponibilité en substrats entre ces deux segments. Les *Pseudomonadota* sont plus tolérantes à l'oxygène, expliquant leur présence dans l'intestin grêle où le taux d'oxygène est plus élevé. A l'inverse, les *Bacteroidota* et les *Bacillota*, bactéries anaérobies sensibles à l'oxygène, prolifèrent en hydrolysant les glucides complexes, et sont majoritaires dans le caecum et le colon proximal

où l'oxygène est réduit et où une grande quantité de glucides complexes est disponible (Kelly et al., 2017). De plus, après le sevrage à 28 jours, les *Bacteroidaceae* (*Bacteroidota*) et *Enterobacteriaceae* (*Pseudomonadota*) diminuent tandis que les *Lactobacillaceae* (*Bacillota*), *Ruminococcaceae* (*Bacillota*), *Veillonellaceae* (*Bacillota*) et *Prevotellaceae* (*Bacteroidota*) augmentent. Ces modifications sont en partie le résultat du changement d'alimentation, les espèces de *Bacteroidaceae* étant particulièrement adaptées au catabolisme des glucides complexes du lait tandis que les *Lactobacillaceae* sont adaptées au lactose et aux glucides dérivés des plantes (Frese et al., 2015). Cet effet de l'alimentation sur le microbiote des porcelets a été démontré en comparant le microbiote de porcelets recevant de l'alimentation solide à différents âges. Le microbiote des porcelets allaités était dominé par *Bacillota* et *Bacteroidota*, cependant les porcelets ayant reçus de l'aliment solide avant le sevrage présentaient un microbiote proche du microbiote des porcelets post-sevrage, avec notamment une abondance plus importante de *Prevotella* (*Bacteroidota*) (Choudhury et al., 2021).

L'effet de l'âge sur le microbiote a été montré chez des lapereaux exclusivement allaités jusqu'à 25 jours d'âge. Au début de la vie, les *Pseudomonadota* dominent avant d'être remplacées par les *Bacteroidota* dès 19 jours, en particulier par les *Bacteroides* qui bénéficient d'un pH intestinal idéal entre 5.4 et 6. De même, entre 18 et 25 jours la part de *Bacillota* augmente (Beaumont et al., 2021). L'introduction d'aliments solides en lien avec l'âge de l'animal augmente la proportion de *Bacillota* dans le caecum, notamment des *Ruminococcaceae* capables de dégrader l'amidon et la cellulose, principaux composants de la ration alimentaire des lapins, tandis que la part des *Bacteroidaceae* diminue (Paës et al., 2022).

### 3. Interaction microbiote-immunité

La colonisation microbienne en début de vie joue un rôle essentiel dans le développement du système immunitaire, comme l'ont démontré les études menées chez des animaux axéniques, dépourvus de microbiote intestinal. En l'absence de microorganismes, les sites de l'immunité muqueuse intestinale sont sous-développés, les plaques de Peyer sont de petite taille, le nombre de plasmocytes et de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de la *lamina propria* est réduit et l'équilibre entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires est affecté. Chez des porcs axéniques de 49 jours, l'augmentation avec l'âge de la taille des follicules lymphoïdes est réduite par rapport au développement normalement observé chez des porcs conventionnels (Pabst and Rothkötter, 1999) tandis que la proportion de lymphocytes est similaire à celle d'un animal conventionnel de 5 jours d'âge avec un nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> qui n'augmente pas (Rothkötter et al., 1991). Le nombre de plasmocytes IgA<sup>+</sup> est trop faible pour être détecté, synonyme d'une faible diversification des lymphocytes B (Butler et al., 2000). En revanche, la colonisation microbienne de porcs axéniques permet l'augmentation du nombre de lymphocytes B et T (Inman et al., 2012).

De même, chez le lapin, le développement des follicules lymphoïdes de l'appendice est limité après ligature de l'appendice vermiforme (Perey and Good, 1968). Les lapins axéniques affichent une paroi intestinale plus fine, les tissus lymphatiques de l'appendice et du *sacculus rotundus* mettent plus de temps à s'organiser en follicules et le nombre de lymphocytes intra épithéliaux est réduit (Štěpánková et al., 1980). Comme indiqué précédemment (I.D.1), à la différence de l'homme et du porc, la diversification du répertoire d'anticorps des lapins n'est pas générée dans la moelle osseuse mais les diversifications somatiques ont lieu dans l'appendice vermiforme (Weinstein et al., 1994). Chez des lapins dont l'appendice a été ligaturée, pour éviter toute colonisation bactérienne, mais pouvant être colonisée par les lymphocytes par voie vasculaire, Rhee et al. (2004) ont remarqué l'absence de lymphocytes B à 4 semaines dans l'appendice vermiforme. L'introduction de bactéries, majoritairement *Bacteroides*, dans la lumière de l'appendice vermiforme entraîne le développement de follicules de lymphocytes B et leur diversification somatique (Rhee et al., 2004).

Par ailleurs, il a été montré dans des modèles murins que *Bacteroides fragilis* permettrait la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en lymphocytes T FOXP3<sup>+</sup> (Round and Mazmanian, 2010), tandis que les bactéries de l'ordre des *Clostridiales* (*Bacillota*) permettent la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th17 dans la *lamina propria* (Farkas et al., 2015). La faible perméabilité épithéliale après la naissance (I.D.1) permet le passage de certains antigènes contribuant à la stimulation du système immunitaire. Certains antigènes passent d'autant plus facilement qu'ils se lient aux IgG du lait maternel et sont transportés par les récepteurs FcRn de l'épithélium, récepteurs transmembranaires qui permettent le transport des IgG. Ces complexes IgG/antigènes sont alors présentés aux cellules présentatrices d'antigènes qui activeront les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Yoshida et al., 2004). Enfin, le microbiote contribuerait à établir l'équilibre entre les phénotypes Th1/Th2 en favorisant le développement des cellules Th1, comme montré par l'administration d'un extrait bactérien contenant des composants de bactéries (Bowman and Holt, 2001).

## II. Rôle des oligosaccharides du lait sur la santé

### A. Devenir des oligosaccharides du lait après ingestion chez le nouveau-né

Bien que peu digestibles par l'hôte, entre 1 et 4 % des oligosaccharides du lait seraient excrétés dans l'urine des nouveau-nés, avec très peu de changement de conformation (Obermeier et al., 1999; Goehring et al., 2014), signifiant que les MOs peuvent passer dans la circulation sanguine et avoir des fonctions systémiques (Dotz et al., 2015; Vazquez et al., 2017). Certains MOs pourraient donc être absorbés dans le plasma mais il semblerait que l'absorption soit spécifique de certaines structures, comme montré chez le rat, où parmi l'ensemble des MOs administrés dans la ration, seul le 3'-SL était absorbé (Jantscher-Krenn et al., 2013). Ce mécanisme pourrait être lié à la différence de type de transport des MOs à travers l'épithélium. Un modèle de lignées cellulaires humaines Caco-2, reproduisant l'épithélium de l'intestin grêle, a montré que les MOs neutres traversent l'épithélium par voie

intracellulaire via une transcytose médiée par les récepteurs ou par transport paracellulaire tandis que les MOs sialylés pénètrent au travers de l'épithélium par transport paracellulaire (Gnoth et al., 2001).

Environ 45% des MOs seraient excrétés dans les fèces (Goehring et al., 2014; Dotz et al., 2015) et certaines structures d'oligosaccharides du lait seraient retrouvées sous forme altérée ou, au contraire, plus complexe, dans les fèces des enfants allaités. Des études analysant *in vitro* la capacité de l'amylase salivaire humaine, l'amylase pancréatique porcine et des vésicules de la membrane de la bordure en brosse intestinale à cliver les MOs selon différentes conditions de pH ont cependant montré que seule une fraction minime de MOs neutres non fucosylés subit des changements (Engfer et al., 2000; Gnoth et al., 2000). Ainsi les modifications observées dans les fèces seraient issues d'une action par des enzymes microbiennes ou endogènes, notamment l' $\alpha$ -2-fucosyltransferase, présente dans le tractus gastrointestinal, qui peut cliver une molécule de fucose des MOs. Il est également possible que certaines sources endogènes, notamment des glycolipides, partageant des similarités de structure avec les MOs, soient dégradées et entraînent l'apparition d'analogues de MOs dans les fèces et urines des enfants (Dotz et al., 2015). Cette altération de certaines structures dans les fèces laisse également supposer une action des microorganismes sur les MOs.

#### B. Les oligosaccharides du lait favorisent la croissance de certaines bactéries commensales

Les MOs promeuvent la croissance sélective de certaines bactéries, qui ont donc un avantage compétitif sur les autres microorganismes de l'intestin, ce qui en fait les premiers prébiotiques naturels. Les prébiotiques étant des ingrédients fermentescibles utilisés sélectivement par les microorganismes de l'hôte, exerçant un effet bénéfique sur la santé (Gibson et al., 2017).

##### 1. Les *Bifidobacterium*, principaux modèles d'études de l'effet prébiotique des oligosaccharides du lait

De nombreuses souches de *Bifidobacterium*, largement présentes dans l'intestin des nouveau-nés humains (Milani et al., 2017), ont la capacité de croître en présence des MOs (Tableau 7). Cette capacité reste cependant espèce, voire souche, spécifique. Ainsi *Bi. breve* et *Bi. bifidum* métabolisent une grande diversité de structures de MOs, tandis *Bi. adolescentis* et *Bi. animalis* ne consomment aucun MO (LoCascio et al., 2007; Ward et al., 2007; Rockova et al., 2012; Ruiz-Moyano et al., 2013; Salli et al., 2021).

Les analyses de transcriptomiques des *Bifidobacterium* ont permis d'identifier des clusters de gènes impliqués dans l'utilisation des oligosaccharides du lait incluant des éléments régulateurs, des systèmes de transport membranaire liant l'ATP, appelés transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette), des protéines liant les glucides ainsi que des glycosides hydrolases (Marcobal and Sonnenburg, 2012). Les glycosides hydrolases (GHs) sont des enzymes catalysant le clivage des liaisons glycosidiques. Ces GHs sont classées en 167 familles, selon leurs structures, dont certaines contiennent des enzymes qui catalysent les structures

spécifiques des MOs (I.B) (Ioannou et al., 2021). Ainsi, la sialidase de la famille GH33 permet de cliver l'acide sialique lié en  $\alpha$ 2-3 ou  $\alpha$ 2-6, présent dans les MOs acides (Kiyohara et al., 2011). De plus, on distingue deux familles de GHs impliquées dans le clivage du fucose, selon la liaison de ce dernier avec les autres monosaccharides, GH95, qui clive le fucose lié en  $\alpha$ -1,2, notamment présent dans 2'-FL et LNFP I, et GH29 qui clive le fucose lié  $\alpha$ -1,3 et  $\alpha$ -1,4, trouvé entre autre dans 3-FL, LNFP II ou encore LNFP III (Ashida et al., 2009). L'hydrolyse de la liaison entre Gal et GlcNAc des MOs de type I (Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc) est catalysée par les lacto-N-biose phosphorylase, tandis que dans les MOs de type II ((Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc) l'hydrolyse est catalysée par les galacto-N-biose phosphorylase, ces deux enzymes appartenant à la famille GH112. Enfin, les lacto-N-biosidases GH20 et GH136 clivent la liaison entre le GlcNAc et le lactose. Puis, de nombreuses  $\beta$ -galactosidases, appartenant aux familles GH1, GH2 et GH42, permettent de libérer le galactose (Figure 20).

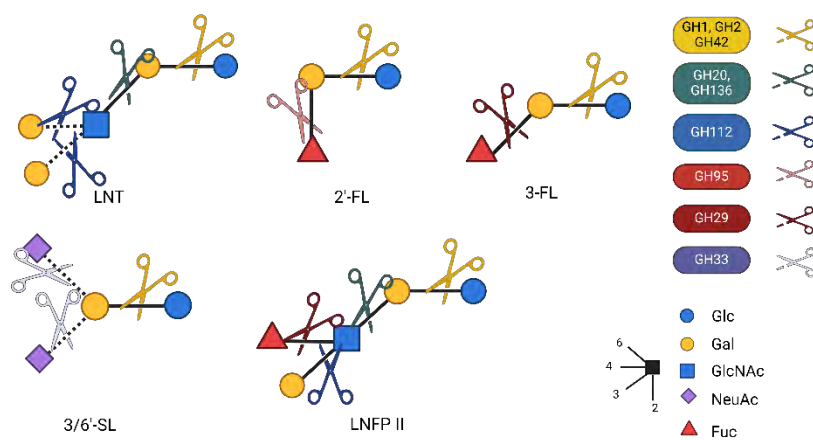


Figure 20 : Enzymes catalysant l'hydrolyse des liaisons des oligosaccharides du lait. Les pointillés indiquent que les deux formes sont possibles. Ce schéma représente des MOs courants présentés dans le Chapitre I. LNT : Lacto-N-tetraose, 2'-FL : 2'-fucosyllactose, 3-FL : 3-fucosyllactose, 3' ou 6'-SL : 3' ou 6'-sialyllactose, LNFP II : Lacto-N-fucopentaose II, GH : Glycoside hydrolase, Glc : glucose, Gal : galactose, GlcNAc : N-acétylglucosamine, NeuAc : Acide N-acétylneuraminique, Fuc : Fucose. Figure créée avec Biorender.

Ces mécanismes de dégradation des MOs, principalement étudiés chez les *Bifidobacterium*, mettent en avant deux stratégies principales (Figure 21) (Garrido et al., 2013) :

- Une hydrolyse extracellulaire, utilisée notamment par *Bi. bifidum*, au cours de laquelle des GHs extracellulaires associées à la paroi bactérienne hydrolysent les MOs à l'extérieur de la cellule en mono ou disaccharides qui seront absorbés par la bactérie ou laissés dans l'environnement. Ainsi *Bi. bifidum* JCM1254 possède une enzyme Lacto-N-biosidase extracellulaire qui lui permet d'hydrolyser l'oligosaccharide neutre de type I lacto-N-tetraose (Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)Glc) en lacto-N-biose (Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc) et lactose (Gal( $\beta$ 1-4)Glc). Le transfert du lacto-N-biose nécessite la présence du transporteur Lacto-N-biose (LNB), tandis que le lactose est hydrolysé par une  $\beta$ -galactosidase extracellulaire (Asakuma et al., 2011).

- Une hydrolyse intracellulaire, utilisée notamment par *Bi. infantis* et *Bi. breve*, qui implique le transport des MOs dans le cytoplasme de la bactérie par des transporteurs ABC pour l'hydrolyse par des GHs dans le cytoplasme (Garrido et al., 2015).

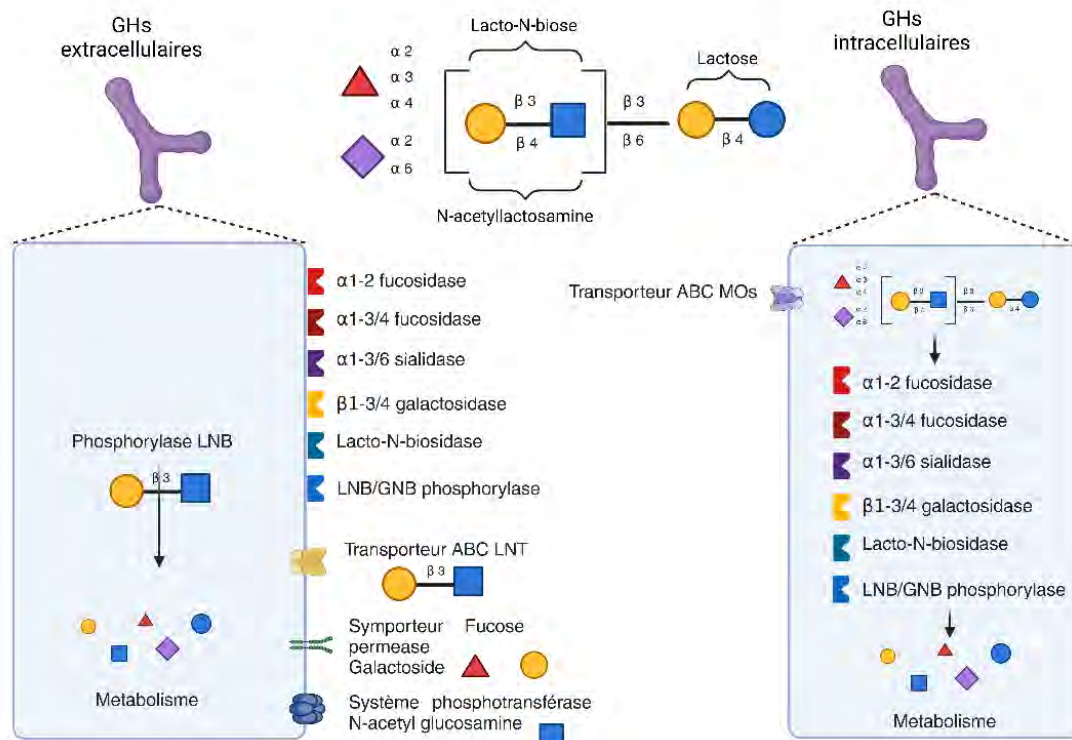


Figure 21 : Mécanisme d'utilisation des oligosaccharides du lait par les Bifidobacterium. Les rectangles bleus représentent les bactéries. GHs : Glycosides hydrolases, LNB : Lacto-N-biose, GNB : Galacto-N-biose. Figure créée avec Biorender, adaptée de Smilowitz et al. (2014).

## 2. Les *Bacteroides*, des bactéries capables de dégrader les oligosaccharides du lait

Les *Bacteroides* sont connus pour leur capacité à utiliser un grand nombre de glucides, notamment ceux présents dans le mucus, similaires structurellement aux MOs, suggérant la capacité de ce genre à dégrader les MOs (McKee et al., 2021). Cette capacité repose sur la présence de loci d'utilisation de polysaccharides (PULs pour polysaccharide utilization loci), des clusters de gènes corégulés qui encodent des protéines impliquées dans la détection, la captation, la digestion enzymatique et le transport de carbohydrates complexes (Grondin et al., 2017). Les PULs sont spécifiques d'un type de glucides et le premier à avoir été identifié est celui pour l'utilisation de l'amidon par *Bacteroides thetaiotaomicron* (McKee et al., 2021). Chaque PUL contient au moins une paire de gènes *SusC* et *SusD* encodant des protéines de surface liant les glucides (Surface glycan-binding protein : SGBPs), des transporteurs TonB-dépendants, des GHs et des régulateurs transcriptionnels dont l'activité est modulée par la présence de carbohydrates détectés par des senseurs spécifiques (Grondin et al., 2017). Plusieurs espèces de *Bacteroides* montrent une croissance notable en culture en présence de MOs (Tableau 7) parmi lesquels *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides caccae*, *Phocaeicola dorei* (anciennement *Bacteroides dorei*) (García-López et al.,

2019)) et *Phocaeicola vulgatus* (anciennement *Bacteroides vulgatus* (García-López et al., 2019)) tandis que *Bacteroides ovatus* et *Bacteroides stercoris* ont une croissance modérée. (Marcobal et al., 2010, 2011; Yu et al., 2013; Salli et al., 2021; Kijner et al., 2022a). Les différentes espèces montrent toutefois des préférences pour certaines structures. Ainsi *B. fragilis* ATCC25285, qui est capable de consommer presque toutes les structures d'un mélange de MOs, dégrade moins bien les MOs fucosylés, tandis que *B. vulgatus* ATCC8482 dégrade davantage les MOs fucosylés (Marcobal et al., 2010). *B. thetaiotaomicron*, en revanche, semble adapté à une large gamme de MOs, avec une dégradation importante de 2'-FL, 3-FL, 3'-SL, 6'-SL, LNT, LNnT et LNFP (Chia et al., 2020).

Le profil de transcriptomique des *Bacteroides* lors d'une culture en présence de MOs a confirmé l'activation des PULs lors de la croissance (Kijner et al., 2024). En revanche les mécanismes de dégradation des MOs ne sont pas identiques au sein du genre bactérien, comme montré avec *B. fragilis* et *B. thetaiotaomicron* qui dégradent les mêmes MOs mais n'activent pas les mêmes PULs (Marcobal et al., 2011). Ces analyses ont également confirmé l'utilisation sélective de certains MOs par les *Bacteroides*. Plus de la moitié des gènes régulés à la hausse dans le génome de *B. fragilis* lors d'une croissance avec les MOs sont dédiés à la capture des MOs acides, leur clivage et au métabolisme de l'acide sialique libéré. A l'inverse *B. thetaiotaomicron* clive l'acide sialique mais n'est pas capable de le métaboliser (Marcobal et al., 2011).

### 3. Phénomène de syntrophie chez les espèces incapables de dégrader les oligosaccharides du lait

A l'inverse, certaines espèces de *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* ou encore *Lactobacillus* affichent une croissance très modérée voire nulle en présence de MOs *in vitro* (Tableau 7) (Marcobal et al., 2010; Yu et al., 2013; Thongaram et al., 2017; Salli et al., 2021). De même, la croissance des souches pathogènes d'*Enterobacteria* n'a pas lieu *in vitro* en présence de 2'-FL, 6'-SL ou LNnT, comme démontré sur des souches isolées de fèces de porcelets allaités (Hoefflinger et al., 2015). Salli et al. (2021) ont étudié la croissance de 16 souches pathogènes *Clostridium*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* et *Shigella* en présence de 2'-FL, 3-FL et difucosyllactose (DFL (Fuc( $\alpha$ 1-2)Gal( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-3)]Glc)) (Tableau 7). Aucune de ces souches n'est capable de pousser avec les MOs. Cependant, l'étude a mis en avant la capacité de certaines souches à consommer les monosaccharides entrant dans la composition des MOs (glucose et fucose). En effet, malgré le nombre limité de bactéries capables de dégrader les oligosaccharides du lait (Ward et al., 2006), d'autres bactéries intestinales peuvent en bénéficier. Certaines bactéries utilisent les mono ou disaccharides libérés par l'hydrolyse extracellulaire (Asakuma et al., 2011). Ce résultat suggère l'existence d'une relation syntrophique (ou de cross feeding) entre pathogènes et organismes commensaux capables d'hydrolyser les MOs.

Après l'hydrolyse extracellulaire des MOs, la métabolisation des composés libérés nécessite des transporteurs membranaires adéquats pour transférer les monosaccharides à l'intérieur de la cellule, et les enzymes pour dégrader le composé. Ainsi, dans le cas des MOs acides, la libération de l'acide N-acétylneuraminique n'implique pas nécessairement son utilisation ultérieure par la bactérie. Il a été montré que les gènes impliqués dans le métabolisme de ce monosaccharide sont organisés dans un opéron composé d'un régulateur *nanR*, des protéines *nanB*, *nanC*, *nanD* et *nanF* représentant un système de transport ABC, d'une sialidase *nanA*, et des activités enzymatiques pour métaboliser le monosaccharide. Certaines bactéries, telles que *B. fragilis*, *P. dorei* et *Bi. breve*, possèdent les gènes pour l'utilisation de ce monosaccharide (Brigham et al., 2009; Egan et al., 2014; Kijner et al., 2024). Cependant, lorsque ce n'est pas le cas, il reste dans l'environnement et peut servir de substrat à d'autres espèces bactériennes. De même, dans le cas d'un MO neutre, le LNT, *Lactobacillus acidophilus* possède les gènes produisant une  $\beta$ -galactosidase extracellulaire lui permettant de cliver le galactose de LNT laissant le lacto-N-triose II (GlcNAc( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)Glc) disponible à d'autres bactéries (Thongaram et al., 2017). Chia et al. (2020) ont mis en avant cette syntrophie avec *B. thetaiotaomicron* et *Anaerostipes caccae*, une *Lachnospiraceae*. Alors que *A. caccae* est incapable de croître en monoculture avec les MOs, la bactérie affiche une croissance importante en coculture avec *B. thetaiotaomicron* et des MOs. Certaines molécules partiellement dégradées en monoculture de *B. thetaiotaomicron* sont totalement dégradées en coculture avec *A. caccae* (LNT, LNFP II, LNFP III, LNFP V).

Tableau 7 : Capacité des souches bactériennes à dégrader les oligosaccharides du lait. Le symbole + signifie que la bactérie dégrade le MO, le symbole ± indique une dégradation partielle, le symbole – indique l’incapacité de la souche à dégrader le MO. LNT : Lacto-N-tetraose ; LNnT : Lacto-N-neotetraose ; 2'-FL ; 2'-fucosyllactose ; 3-FL : 3-fucosyllactose ; DFL : difucosyllactose ; LDFT : lactodifucotetraose ; 3'-SL : 3'-sialyllactose ; 6'-SL : 6'-sialyllactose.

	Mélange de MOs	LNT	LNnT	2'-FL	3-FL	DFL	LDFT	3'-SL	6'-SL
<i>Akkermansia muciniphila</i>	+	+	+	+	+	+		+	+
<i>B. caccae</i> ATCC43185 (Marcobal et al., 2011)	+								
<i>P. dorei</i> (Kijner et al., 2022a)		+	+	±		-		+	+
<i>P. dorei</i> 2 (Kijner et al., 2022a)		±	±	-		-		+	+
<i>B. fragilis</i> DSM 2151 (Marcobal et al., 2010; Yu et al., 2013; Salli et al., 2021)	+			+	+	+	+	-	±
<i>B. fragilis</i> (Kijner et al., 2022a)		+	+	+		±		+	+
<i>B. ovatus</i> (Kijner et al., 2022a)		-	-	-		-		-	-
<i>B. ovatus</i> ATCC8483 (Marcobal et al., 2011)	±								
<i>B. stercoris</i> (Kijner et al., 2022a)		-	-	-		-		-	-
<i>B. stercoris</i> ATCC43183 (Marcobal et al., 2011)	±								
<i>B. thetaiotaomicron</i> DSM 2079 (Marcobal et al., 2011; Salli et al., 2021)	+		-	±	±	±			
<i>B. thetaiotaomicron</i> VPI-3731 (Marcobal et al., 2011)	+		-						
<i>B. thetaiotaomicron</i> VPI-7330 (Marcobal et al., 2011)	+		-						
<i>P. vulgatus</i> (Kijner et al., 2022a)		+	+	+		+		+	+
<i>P. vulgatus</i> 2 (Kijner et al., 2022a)		+	+	±		-		+	+
<i>P. vulgatus</i> ATCC 8482 (Marcobal et al., 2010; Yu et al., 2013; Salli et al., 2021)	+			+	+	+	+	±	+
<i>B. uniformis</i> CL03T12C37 (Kijner et al., 2022a)									
<i>Bi. adolescentis</i> ATCC 15703 (Thongaram et al., 2017)			-	-	-			-	-
<i>Bi. adolescentis</i> DSM 20083 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Bi. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> ATCC 25527 (Thongaram et al., 2017)			-	-	-			-	-
<i>Bi. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 (Thongaram et al., 2017)			-	-	-			-	-
<i>Bi. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bf-6 (Thongaram et al., 2017)			-	-	-			-	-
<i>Bi. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bi-07 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Bi. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BI-04 (Salli et al., 2021)				-	-	-			

<i>Bi. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> B420 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Bi. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> DSM 10140 (Garrido et al., 2015; Thongaram et al., 2017; Salli et al., 2021)	-	-	-	-	-	-		-	-
<i>Bi. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Bi. breve</i> ATCC 15700 (LoCascio et al., 2007; Thongaram et al., 2017; Salli et al., 2021)	±	+	+	-	-	-		-	-
<i>Bi. breve</i> Bb-03 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Bi. breve</i> M-16V (Thongaram et al., 2017)			-	-	-			-	-
<i>Bi. bifidum</i> ATCC 29521 (Garrido et al., 2015; Thongaram et al., 2017; Salli et al., 2021)	-	+	-	-	-	-		-	-
<i>Bi. bifidum</i> Bb-06 (Salli et al., 2021)				+	+	+			
<i>Bi. bifidum</i> JCM 1254 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				-
<i>Bi. bifidum</i> JCM 1209 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				-
<i>Bi. bifidum</i> JCM 7002 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. bifidum</i> JCM 7003 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. bifidum</i> JCM 7004 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. bifidum</i> PRL2010 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. bifidum</i> S28-a (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. bifidum</i> SC112 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. bifidum</i> SC126 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. bifidum</i> SC555 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. bifidum</i> SC572 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. bifidum</i> SC583 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. catenulatum</i> DSM 16992 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Bi. longum</i> BB536 (Thongaram et al., 2017)			-	-	-			-	-
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697 (Yu et al., 2013; Garrido et al., 2015; Thongaram et al., 2017; Salli et al., 2021)	+	+	+	+	+	+	+	±	+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 25962 (Yu et al., 2013; Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+		+	-	+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 17930 (Yu et al., 2013; Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+		+	-	+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15702 (Yu et al., 2013; Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+		+	+	+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> Bi-26 (Salli et al., 2021)				+	+	+			
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> JCM 7007 (Yu et al., 2013; Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+		+	+	+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> JCM 7009 (Yu et al., 2013; Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+		+	+	+

<i>Bi. longum</i> subsp. <i>longum</i> JCM7010 (Yu et al., 2013)				+	+		+	+	+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> JCM 7011 (Yu et al., 2013; Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+		+	+	+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> JCM 11347 (Yu et al., 2013)				+	+		+	+	+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> M-63 (Thongaram et al., 2017)			+	+	+			±	±
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> SC30 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> SC97 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> SC117 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> SC142 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> SC143 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> SC145 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> SC268 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> SC417 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> SC523 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> SC569 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> SC600 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> SC605 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> SC638 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> SC680 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> SC30 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>infantis</i> SC30 (Garrido et al., 2015)	+	+	+	+	+				+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>longum</i> ATCC 15708 (Yu et al., 2013)				±	+		±	±	+
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>longum</i> BI-05 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>longum</i> DJO10A (LoCascio et al., 2007)	±								
<i>Bi. longum</i> subsp. <i>longum</i> DSM 2019 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Bi. pseudocatenuatum</i> DSM 20438 (Salli et al., 2021)				+	+	+			
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC13124 (Marcobal et al., 2010; Yu et al., 2013)	+			-	-		-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i> AB1 (Marcobal et al., 2010)	+								
<i>Clostridioides difficile</i> AB2 (Marcobal et al., 2010)	-								
<i>Clostridioides difficile</i> DSM 1296 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Clostridioides difficile</i> CCUG 46468 (Salli et al., 2021)				-	-	-			

<i>Clostridioides difficile</i> NCTC 13574 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Clostridium perfringens</i> E-98861 T (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Clostridium leptum</i> ATCC29065 (Yu et al., 2013)				-	-		-	-	-
<i>Cronobacter sakazakii</i> DSM 4485 (Salli et al., 2021)				-	±	-			
<i>Cronobacter sakazakii</i> BAA-894 (Salli et al., 2021)				-	±	-			
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 (Yu et al., 2013)				±	±		-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29200 (Yu et al., 2013)				-	-		-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> OG1RF (Marcobal et al., 2010)	-								
<i>Enterococcus faecalis</i> KA117 (Marcobal et al., 2010)	-								
<i>Escherichia coli</i> O1: K1: H7 (Salli et al., 2021)				-	±	-			
<i>Escherichia coli</i> O111: K58 (B4): H2 (Salli et al., 2021)				-	±	-			
<i>Escherichia coli</i> O142: K86 (B): H6 (Salli et al., 2021)				-	±	-			
<i>Escherichia coli</i> O111: K58 (B4): H- (Salli et al., 2021)				-	±	-			
<i>Escherichia coli</i> O20: K84: H26 (Salli et al., 2021)				-	±	-			
<i>Escherichia coli</i> OP50 (Marcobal et al., 2010)	+								
<i>Escherichia coli</i> EC100 (Marcobal et al., 2010)	-								
<i>Escherichia coli</i> K12 (Yu et al., 2013)				-	-		-	-	-
<i>Eubacterium rectale</i> ATCC35183 (Marcobal et al., 2010)	+								
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC13048 (Yu et al., 2013)				-	-		-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> ATCC13047 (Yu et al., 2013)				-	-		-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM 20079 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM (Marcobal et al., 2010; Thongaram et al., 2017; Salli et al., 2021)	+		+	-	-	-		-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-14 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 (Thongaram et al., 2017)			+	-	-			-	-
<i>Lactobacillus gasseri</i> ATCC 33323 (Thongaram et al., 2017)			-	-	-			-	-
<i>Lactobacillus gasseri</i> Lg-36 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Lactobacillus fermentum</i> CECT 5716 (Thongaram et al., 2017)			-	-	-			-	-
<i>Lactobacillus jensenii</i> ATCC 25258 (Thongaram et al., 2017)			-	-	-			-	-
<i>Lactobacillus johnsonii</i> ATCC 11506 (Thongaram et al., 2017)			-	-	-			-	-
<i>Lactobacillus johnsonii</i> ACD-1/La-1 (Thongaram et al., 2017)			-	-	-			-	-

<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> DSM 5622 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> Lpc-37 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> LCV-1 (Thongaram et al., 2017)			-	-	-			-	-
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> DSM 20174 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> Lp-115 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> LP-66 (Thongaram et al., 2017)			±	-	-			-	-
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 (Thongaram et al., 2017)			±	-	-			-	-
<i>Lactocaseibacillus casei</i> DSM 20011 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Lactocaseibacillus casei</i> Lc-11 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> DSM 20021 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> HN001 (Thongaram et al., 2017; Salli et al., 2021)			-	-	-	-		-	-
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> ATCC 53103, GG (Yu et al., 2013; Thongaram et al., 2017; Salli et al., 2021)			-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> Lr-32 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC7830 (Yu et al., 2013)				±	±		-	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Lb-87 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Levilactobacillus brevis</i> Lbr-35 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> Ls-33 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> SBS-1 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> 1E1 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Lactococcus lactis</i> IL1403 (Marcobal et al., 2010)	+								
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> Li-23 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 (Yu et al., 2013)				-	-		-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990 (Yu et al., 2013)				-	-		-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> St-21 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ; serotype Typhimurium DSM 17058 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ; serotype Poona NCTC 4840 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ; serotype Typhimurium NCTC 13954 (Salli et al., 2021)				±	±	±			
<i>Shigella flexneri</i> DSM 4782 (Salli et al., 2021)				-	-	-			
<i>Shigella flexneri</i> CCUG 39080 (Salli et al., 2021)				-	-	-			

<b><i>Streptococcus thermophilus</i> MTC 330 (Marcobal et al., 2010)</b>	+								
<b><i>Streptococcus thermophilus</i> MTC 360 (Marcobal et al., 2010)</b>	+								
<b><i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258 (Yu et al., 2013)</b>				±	±		-	-	-
<b><i>Veillonella parvula</i> ATCC 10790 (Marcobal et al., 2010)</b>	-								
<b><i>Weissella confusai</i> DSM 20196 (Salli et al., 2021)</b>				-	-	-			

### C. Effets antimicrobiens

L'effet antimicrobien des oligosaccharides du lait résulte à la fois d'un phénomène indirect, lié à la capacité de certaines bactéries à métaboliser les oligosaccharides (II.B) et occuper la niche intestinale, ainsi que de l'action des MOs en tant qu'inhibiteurs de l'adhésion des pathogènes.

Les pathogènes infectent leur hôte en se liant aux molécules glycoconjugués de surface des cellules de la muqueuse épithéliale, par le biais de lectines présentes sur la surface des pathogènes (Karlsson, 1989). Les MOs possèdent des similarités de structure avec les glucides conjugués de surface de certaines cellules de la muqueuse épithéliale et se fixent sur le domaine de reconnaissance des pathogènes, agissant comme des leurres en les empêchant de se lier aux cellules intestinales de l'hôte (El-Hawiet et al., 2015). *Campylobacter jejuni*, l'une des bactéries les plus impliquées dans les diarrhées infantiles, infecte l'hôte en se liant à des motifs glucidiques fucosylés. Ruiz-Palacios et al. (2003) ont montré *in vitro* la capacité de 2'-FL à se lier à cette bactérie et l'ont confirmé *in vivo*. De même, des quantités réduites de 2'-FL sont associées à un taux plus important de diarrhées causées par *C. jejuni* chez des nouveau-nés (Morrow et al., 2004). En particulier, des doses physiologiques de 2'-FL administrées *in vivo* à des souris ont démontré la capacité de cet oligosaccharide du lait fucosylé à réduire la colonisation de *E. coli* O157 dans l'iléon et le colon (Wang et al., 2020). *Helicobacter pylori*, est également impliquée dans des maladies intestinales après colonisation de l'hôte par adhésion sur les glucides fucosylés du mucus et des cellules épithéliales intestinales. Les MOs exercent également une activité bactériostatique en inhibant les biofilms des streptocoques du groupe B, perturbant leur attachement aux cellules hôtes, comme démontré par Ackerman et al. (2017) dans des modèles *in vitro*.

Le rôle de protection des MOs contre les pathogènes concerne également les virus (Moore et al., 2021). Le virus influenza reconnaît des oligosaccharides contenant des acides sialiques liés au galactose en  $\alpha$ 2-6 ou  $\alpha$ 2-3. Ainsi, les oligosaccharides du lait 3'-SL et 6'-SL sont capables de réduire l'infection par le virus de l'influenza en se liant à ce dernier (Yu et al., 2012). Les norovirus humains interagissent avec les antigènes tissulaires du groupe sanguin, carbohydrates complexes présents, entre autres, à la surface de la muqueuse épithéliale. Une étude en cristallographie a démontré qu'il s'agit d'une interaction protéines-glucides (Tan and Jiang, 2011), qui constitue l'un des principaux mécanismes d'attachement du virus, à l'origine de nombreuses gastroentérites. Weichert et al. (2016) ont montré que le 2'-FL et le 3-FL miment la structure des antigènes du groupe sanguin et se lient aux norovirus, empêchant ces derniers de se fixer à la mucine gastrique porcine. Les MOs seraient également efficaces sur les rotavirus, principaux agents à l'origine des diarrhées chez les enfants (Tate et al., 2016). Ces virus possèdent des protéines de surface responsables de l'attachement aux antigènes tissulaires du groupe sanguin. L'efficacité de 2'-FL, 3'-SL et 6'-SL a été montrée sur des lignées cellulaires MA104, dérivées de cellules épithéliales de rein de singe, *in vitro*. Les auteurs ont mis en évidence un effet direct de ces MOs sur le virus plutôt que sur les cellules épithéliales.

De plus, l'efficacité des MOs est dépendante de leur structure et de la souche du virus puisque la souche virale sur laquelle les oligosaccharides du lait acides montrent le plus d'efficacité diffère de celle sur laquelle le 2'-FL inhibe le plus fortement le virus (Laucirica et al., 2017). Cette relation structure-fonction des MOs a également été démontrée *in vitro* sur des souches de rotavirus porcins, les MOs 3'-SL et 6'-SL réduisent la liaison des souches virales aux lignées cellulaires MA104, contrairement à l'oligosaccharide du lait neutre LNnT (Hester et al., 2013).

Certains pathogènes utilisent, au contraire, les glucides présents à leur surface pour se lier aux lectines des cellules de l'hôte. Dans ce contexte, les MOs peuvent inhiber l'adhésion des pathogènes à la muqueuse épithéliale de façon indirecte, en se fixant sur les lectines épithéliales à la place du pathogène (Moore et al., 2021). Ainsi, les virus du sida, de l'hépatite C ou encore le virus Ebola, lient les glycoprotéines de leur surface au récepteur DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM3<sup>+</sup>-grabbing non integrin) des cellules dendritiques. Ces récepteurs reconnaissent notamment les antigènes du groupe sanguin Lewis, structure présente dans les MOs (van Liempt et al., 2006). Hong et al. (2008) ont montré qu'un mélange de MOs pouvait réduire jusqu'à 80% la liaison du virus du sida au récepteur DC-SIGN, en se fixant directement aux cellules dendritiques. Leur étude n'indique pas les structures spécifiques de MOs qui se lient aux cellules dendritiques, mais une analyse du mélange indique une forte présence de types fucosylés.

#### D. Renforcement de la barrière épithéliale

La barrière épithéliale est une des premières lignes de défense de la muqueuse, primordiale pour protéger l'hôte, elle n'est cependant pas totalement développée chez le nouveau-né (I.A).

##### 1. Action sur la prolifération et la différenciation des cellules

Les cellules de l'épithélium intestinal sont en permanence en prolifération, différenciation et apoptose. L'arrêt de la prolifération ou l'augmentation de l'apoptose corrèle avec une augmentation de la différenciation dans les lignées cellulaires (Sambuy et al., 2005). Kuntz, Rudloff, Kunz (2008) ainsi que Holscher, Bode, Tappenden (2017) ont mis en évidence la capacité des MOs, qu'ils soient sous forme de fractions complexes d'origine humaine ou sous forme de structures individuelles (2'-FL, 3'-SL et 6'-SL), à inhiber la prolifération et induire la différenciation de la lignée cellulaire humaine cancéreuse HT-29, modèle de cellules épithéliales intestinales, suggérant le rôle des MOs dans la maturation de l'épithélium intestinal. Ces effets ont également été observés dans la lignée cellulaire humaine d'entérocytes Caco-2. Dans cette étude, les MOs 2'-FL, 6'-SL et LNnT ont réduit la prolifération des cellules Caco-2 et HT-29, en revanche le 2'-FL avait le plus d'effet sur l'augmentation de la différenciation (Holscher et al., 2014).

Ainsi, les études *in vitro* ont mis en avant la capacité des oligosaccharides du lait à diminuer la prolifération des cellules épithéliales intestinales. A l'inverse, les oligosaccharides induisent la

différenciation de ces cellules, comme montré notamment par la mesure de l'alkaline phosphatase, marqueur de différenciation. Les oligosaccharides du lait seraient donc des facteurs inductifs de la maturation intestinale. Il semblerait que les MOs agissent sur certaines voies de régulation et de signalisation, telles que la MAPK (Mitogen-activated protein kinase), associées, entre autres, à la différenciation, la prolifération et la progression du cycle cellulaire (Kuntz et al., 2019; Wang et al., 2019a).

## 2. Impact fonctionnel sur la perméabilité

Les MOs agissent également sur la fonctionnalité de la barrière intestinale via la régulation de la perméabilité intestinale et de l'intégrité de la muqueuse. Dans des modèles *in vitro* d'organoïdes intestinaux en conditions inflammatoires, l'exposition à un mélange de MOs a permis de réduire la perméabilité paracellulaire et transépithéliale (Wu et al., 2019a). Les MOs permettent également de renforcer les jonctions entre les cellules épithéliales, réduisant le risque de pénétration des pathogènes. L'influence des MOs sur la perméabilité intestinale a également été mise en évidence dans des modèles *in vivo*. L'exposition de souris dont la muqueuse intestinale présente des lésions et des translocations paracellulaires élevées aux MOs a permis de réduire la perméabilité paracellulaire et transépithéliale (Wu et al., 2019a).

## 3. Impact fonctionnel sur la production de mucus

Les oligosaccharides du lait renforcent l'épithélium intestinal en contribuant notamment au développement de la couche de glycocalyx, essentielle pour protéger la muqueuse contre les pathogènes et pour permettre l'adhésion des bactéries commensales. Kong et al. (2019) ont montré que le 2'-FL et le 3-FL permettent d'augmenter les glycosaminoglycanes, à savoir l'héparane sulfate et l'acide hyaluronique, deux polysaccharides contribuant à l'élasticité et la viscosité du glycocalyx, dans un modèle de lignée cellulaire Caco-2. Il convient de noter que, bien que 2'-FL et 3-FL soient structurellement proches, 3-FL démontre une plus grande capacité que 2'-FL à renforcer le glycocalyx. De plus les MOs contribuent à la sécrétion de la couche de mucus protectrice par interaction avec les cellules caliciformes. Dans des modèles *in vitro* d'organoïdes intestinaux en conditions inflammatoires, l'exposition aux MOs a ainsi permis d'augmenter la production de la protéine Muc2, forme prédominante de mucine de l'intestin grêle. L'exposition de lignées cellulaires Caco-2, représentatives des cellules épithéliales et des lignées cellulaires humaines LS174T, représentatives des cellules caliciformes, à un mélange de MOs a confirmé ces résultats en montrant une plus forte expression du gène MUC2, encodant la production d'une mucine (Wu et al., 2019a). De même, dans les lignées cellulaires LS174T, le 3-FL augmente l'expression du gène MUC2 et des gènes des protéines stabilisatrices de la mucine (TFF3 et RETNLB) (Cheng et al. 2020). Enfin, dans un modèle *in vivo* de souris adultes nourries avec une ration riche en gras, la supplémentation en 2'-FL induit une augmentation de l'expression des marqueurs Elf3 et Hes1 impliqués dans la différenciation des cellules caliciformes et une augmentation de l'expression des principaux composants du mucus, parmi lesquels Muc2, dans le colon (Paone et al., 2024).

#### 4. Impact fonctionnel sur la réponse immunitaire

Les MOs régulent également la réponse inflammatoire des cellules épithéliales. 3'-SL inhibe l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-8, IL-12 et TNF- $\alpha$  par les cellules Caco-2. Ce mécanisme repose sur l'activation de deux voies : l'augmentation de l'expression du gène du récepteur PPAR $\gamma$ , un PRR présent sur les cellules épithéliales, qui augmente l'expression du gène codant pour la protéine de reconnaissance des peptidoglycanes 3 (PGLYRP3 pour peptidoglycan recognition protein 3). L'activation de cette dernière réduit la production de cytokines pro-inflammatoires par inhibition de la voie NF- $\kappa$ B (Zenhom et al., 2011). Une autre étude *in vitro* sur des lignées cellulaires humaines T84 et HeLa, représentant les cellules épithéliales intestinales, a montré que 2'-FL réduit l'expression du corécepteur de surface CD14, essentiel à la reconnaissance de LPS par TLR4, ce qui réduit la réponse inflammatoire à la reconnaissance de LPS lors d'infections *in vitro* à *E. coli* notamment. Cette diminution de reconnaissance de LPS réduit l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 (He et al., 2016). Sodhi et al. (2021) ont également démontré qu'une supplémentation de formules infantiles en 2'-FL ou 6'-SL fournies à des souris ou des porcelets atteints d'entérocolite nécrosante (NEC), entraînant une nécrose de la muqueuse intestinale, réduit la sévérité de la nécrose, à la différence d'une supplémentation avec du lactose. Les auteurs ont ensuite utilisé un modèle *in vitro* de lignées cellulaires IEC-6 d'entérocytes épithéliaux de rat, pour mettre en évidence le mécanisme d'action de ces deux MOs. 2'-FL et 6'-SL inhiberaient la signalisation TLR4, en se liant directement à ce récepteur sur les cellules épithéliales, réduisant de fait la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, responsable de l'activation de la réponse inflammatoire. Enfin, l'exposition de HT-29, lignée cellulaire épithéliale du colon humain, aux MOs induit l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-17C, normalement induite par la rencontre avec un antigène bactérien ou IL-1 $\beta$ . Cette dernière étant également régulée à la hausse dans l'étude. IL-17C régule elle-même à la hausse l'expression des chimiokines CXCL1, CXCL3, CCL20 et de la cytokine IL-8, ces derniers étant également augmentés dans l'étude. Cette induction permettrait de protéger le nouveau-né en cas d'infection mais également d'éduquer le système immunitaire (Lane et al., 2013).

##### E. Action directe sur la réponse immunitaire

Les MOs exercent également une action directe sur les cellules immunitaires, indépendamment des effets résultants de leur fermentation par le microbiote.

##### 1. Liaisons des oligosaccharides du lait aux cellules immunitaires

Les lectines sont des récepteurs protéiques présents à la surface des cellules immunitaires parmi lesquels les Siglecs (Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin), les sélectines, les lectines de type C et les galectines se lient aux glucides et exercent diverses fonctions immunomodulatrices. Certains MOs peuvent se lier à ces récepteurs et, par un rôle agoniste ou antagoniste, les moduler (Triantis et al., 2018).

Les Siglecs sont des récepteurs membranaires des cellules hématopoïétiques capables de reconnaître les résidus d'acide sialique (Crocker et al., 2007). L'interaction de ces derniers avec des ligands sialylés induirait la régulation de la production de cytokines par les cellules dendritiques et les macrophages. Ainsi l'activation de Siglec-E réduit la sécrétion de TNF- $\alpha$  tandis que l'activation de Siglec-9 diminue la production d'IFN- $\gamma$ . De même, la liaison de ligands sialylés sur le récepteur Siglec-1, exprimé sur les macrophages, réduit l'activation de ces cellules immunitaires (Pillai et al., 2012). L'analyse des interactions entre molécules, a permis de mettre en évidence des liaisons spécifiques entre plusieurs Siglecs et certains MOs. Ainsi, 3'-SL se lie spécifiquement au Siglec-4, tandis que 6'-SL se lie au Siglec-2 (Figure 22) (Koliwer-Brandl et al., 2011).

Les oligosaccharides du lait acides interagissent également avec les sélectines, des molécules d'adhésion présentes sur les cellules endothéliales impliquées dans la capture des leucocytes circulants (Figure 22) (Rudloff et al., 2002). Ainsi, les MOs 3'-SL et 3'-sialyl-3-fucosyllactose (F-SL) (NeuAc( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-4)[Fuc( $\alpha$ 1-3)]Glc) inhibent l'adhésion des monocytes, lymphocytes et neutrophiles aux cellules endothéliales lors de l'inflammation en se liant aux sélectines (Bode et al., 2004).

De plus les lectines de type C DC-SIGN, présentes sur les cellules présentatrices d'antigènes, font des liaisons robustes avec les oligosaccharides du lait contenant un résidu  $\alpha$ 1-4-fucose ainsi qu'avec 2'-FL et 3-FL (Noll et al., 2016b). Cette liaison de certains MOs aux récepteurs DC-SIGN des cellules dendritiques de la *lamina propria* intestinale peut empêcher l'adhésion bactérienne aux cellules dendritiques. Ceci n'a pas été démontré directement avec les MOs mais avec la protéine glycosylée Mucin-1, présente dans le lait humain, qui possède l'antigène Le<sup>x</sup> qui serait responsable de la liaison avec DC-SIGN (Saeland et al., 2009; Koning et al., 2015).

Enfin, les galectines, présentes chez les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B et T activés, jouent un rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire en induisant la sécrétion des cytokines spécifiques des lymphocytes T régulateurs (Rabinovich and Toscano, 2009). Ces récepteurs peuvent être associés à la surface cellulaire et modifier la signalisation intracellulaire lors de leur activation, mais ils peuvent aussi être sécrétés pour se lier aux récepteurs d'autres cellules et réguler leurs fonctions (Figure 22) (Rapoport et al., 2008). De nombreux oligosaccharides du lait interagissent avec ces récepteurs (Noll et al., 2016a). En effet, 25 MOs peuvent se lier à 4 galectines, à savoir Galectine-1, Galectine-3, Galectine-7 et Galectine-9 (Shams-Ud-Doha et al., 2017). De façon intéressante, chaque galectine humaine présente une spécificité de liaison pour des motifs particuliers. Par exemple la Galectine-7 se lie préférentiellement aux MOs portant le motif Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc à l'extrémité non réductrice tandis que la Galectin-4 se lie avec une forte affinité à LNFP I (Noll et al., 2016a).

Les oligosaccharides du lait exercent également leur action anti inflammatoire en se liant aux récepteurs TLR (Figure 22). Ces récepteurs reconnaissent les PAMPs et initient la signalisation NF- $\kappa$ B, résultant en la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires (Akira and Takeda, 2004). En se liant aux TLR, les MOs permettraient d'éduquer le système immunitaire inné. L'effet des oligosaccharides du lait sur les récepteurs TLR dépend cependant de la structure des MOs. 3-FL active le récepteur TLR2 tandis que 2'-FL, 6'-SL et LNnT inhibent TLR5 et 7. Il est important de noter que 2'-FL et 3-FL possèdent la même composition de monosaccharides, seules les liaisons changent, ce qui semble tout de même avoir un impact important sur les récepteurs auxquels ces molécules peuvent se lier (Cheng et al., 2019).

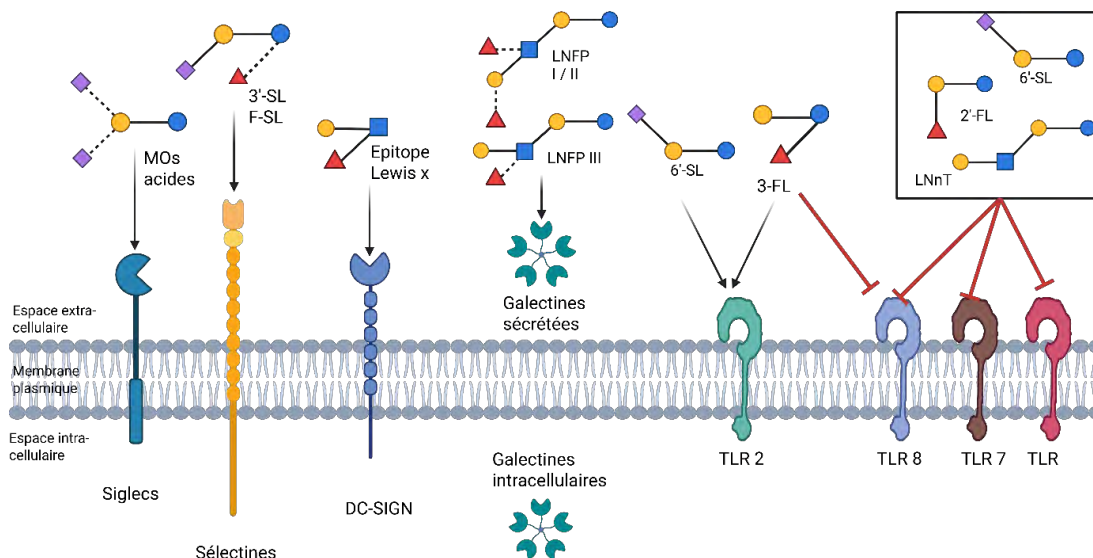


Figure 22 : Représentation schématique de la liaison des MOs aux lectines des cellules immunitaires. Les pointillés indiquent que les deux formes sont possibles, avec ou sans le monosaccharide. F-SL : 3'-Sialyl-3'-fucosyllactose ; LNnT : Lacto-N-neotetraose, 2'-FL : 2'-fucosyllactose, 3-FL : 3-fucosyllactose, 3' ou 6'-SL : 3' ou 6'-sialyllactose, LNFP : Lacto-N-fucopentaose. Figure créée avec Biorender, adaptée de Singh et al. (2022).

## 2. Propriétés anti inflammatoires des oligosaccharides du lait

Des essais *ex vivo* utilisant une muqueuse intestinale fœtale humaine, reflétant la muqueuse intestinale immature des nouveau-nés, en présence d'oligosaccharides du colostrum ont montré la capacité de ces derniers à induire la maturation de la réponse immunitaire. Ainsi, les MOs réduisent l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-1 $\beta$ , et favorisent la différenciation des lymphocytes T en phénotype FOXP3<sup>+</sup> régulateur (He et al., 2014). De même, un mélange de MOs en culture avec des cellules dendritiques immatures régule à la hausse la production des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et IL-27. Lorsque ces cellules sont incubées avec du LPS, qui induit l'inflammation, et un mélange de MOs, les auteurs ont observé une réduction de la production des cytokines pro-inflammatoires IL-12, IL-6 et TNF- $\alpha$ , par rapport aux cellules dendritiques incubées avec du LPS seul. Dans cette étude les chimiokines CXCR3 et CCR7 étaient également régulées à la hausse, laissant penser que les MOs favorisent la circulation des cellules dendritiques vers les organes lymphoïdes où ces

dernières agissent sur les lymphocytes T. En effet, les cellules dendritiques activées entraînent un phénotype T régulateur CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> plus élevé qu'en l'absence d'activation préalable par les MOs. L'ajout d'agoniste de TLR4 et de DC-SIGN réduit la production d'IL-10, confirmant que les MOs agissent par liaison à ces récepteurs (Xiao et al., 2019). L'étude de PBMCs dont l'inflammation a été induite par un oligodeoxynucleotide contenant des motifs cytosine-phosphate-guanine (CpG), un ligand de TLR9 mimant la présence d'ADN bactérien, avec des MOs a également mis en évidence ce rôle anti-inflammatoire. Le LNnT est capable de réduire la production de la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$ . Les MOs sialylés 3'-SL et 6'-SL augmentent, quant à eux, la quantité de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Zuurveld et al., 2023) au même titre que le LNFP III (Velupillai and Harn, 1994).

Ces effets immunomodulateurs ont également été observés *in vivo*. L'ajout de 2'-FL dans une formule infantile résulte en une concentration inférieure de cytokines pro-inflammatoires, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6, dans le plasma comparé aux enfants nourris avec une formule infantile sans 2'-FL. D'ailleurs, le profil de cytokines des enfants recevant la formule supplémentée est plus proche de celui des enfants allaités que celui des enfants nourris avec une formule infantile seule (Goehring et al., 2016). De plus, chez des rats allaités gavés avec 2'-FL, les cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  sont réduites dans l'intestin grêle (Azagra-Boronat et al., 2019).

### 3. Maturation des cellules immunitaires et développement de la tolérance par l'équilibre de la balance Th1/Th2

Les MOs favorisent la maturation des cellules immunitaires innées mais également adaptatives. Un modèle de cellules dendritiques de la moelle osseuse a montré que le nombre de cellules dendritiques portant les molécules de costimulation CD40<sup>+</sup> et CD86<sup>+</sup>, signe de maturation des cellules, augmente en présence de 2'-FL. Ce changement fonctionnel, permis par les MOs, contribue à l'activation des lymphocytes T dans les PBMCs comme le montre l'augmentation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> *in vitro* (Xiao et al., 2018a). Le taux de lymphocytes T du ganglion lymphatique mésentérique est plus élevé chez des rats allaités gavés avec le 2'-FL de 2 à 16 jours que chez des rats allaités ne recevant pas de 2'-FL, tandis que celui des lymphocytes B est diminué. Ces derniers sont probablement devenus des plasmocytes sécrétant les IgG et IgA plasmatiques dont la concentration augmente (Azagra-Boronat et al., 2019). Enfin, dans un modèle de lymphocytes T du sang du cordon ombilical stimulés avec des MOs acides isolés du lait humain, dont la composition exacte est inconnue, la proportion de lymphocytes T régulateurs exprimant le marqueur CD25, signe d'une précédente activation, est augmenté (Eiwegger et al., 2004).

De plus les oligosaccharides du colostrum stimulent la production des cytokines de type Th1 tout en diminuant la production des cytokines de type Th2, permettant de rééquilibrer la balance des lymphocytes T helper, dans un modèle d'explants de fragments de muqueuse intestinale fœtale humaine (He et al., 2014). L'exposition des cellules épithéliales à 2'-FL, et 3-

FL dans une moindre mesure, augmente la production de la cytokine IFN- $\gamma$ , qui oriente les lymphocytes vers un phénotype Th1, et de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 tout en réduisant la production de la cytokine IL-13, caractéristique des lymphocytes Th2. Ce mécanisme repose sur la sécrétion de galectine-9 par les cellules épithéliales qui fonctionne comme un modulateur en se liant aux récepteurs des cellules immunitaires (Ayeche-Muruzabal et al., 2020; Zuurveld et al., 2023). Dans des PBMCs en conditions inflammatoires, LNnT est capable de réduire la production de la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$ , tandis que 3-FL augmente IFN- $\gamma$ , ce qui suggère le développement des lymphocytes de phénotype Th1 (Zuurveld et al., 2023). De même, les MOs acides stimulent les lymphocytes T du sang du cordon ombilical vers un phénotype Th1 *in vitro*, comme montré par la production augmentée d'IFN- $\gamma$ , ce qui permet de rééquilibrer les lymphocytes Th1/ Th2 (Eiwegger et al., 2004). Cet effet des MOs acides a également été observé avec 3'-SL qui stimule les cellules dendritiques par le biais d'une liaison avec TLR4, entraînant la prolifération de cytokines pro-inflammatoires induisant les phénotypes Th1 et Th17. En effet chez des souris déficientes en TLR4 l'effet est atténué. Cet effet pro-inflammatoire permet d'éduquer et de préparer le système immunitaire (Kurakevich et al., 2013).

Ces effets sur la balance Th1/Th2 semblent cependant varier selon la structure des MOs. Certaines études indiquent en effet que les MOs fucosylés pourraient favoriser une activité Th2, réduisant notamment la réponse inflammatoire. Une étude sur des PBMCs humains en culture montre une réduction de la prolifération des cellules mononuclées ainsi que de la production d'IFN- $\gamma$  et IL-12, deux cytokines qui induisent la prolifération des lymphocytes de type Th1, lors d'une supplémentation avec 2'-FL et LNFP-I (Sotgiu et al., 2006). Les recherches de Thomas et al. (2003) ont montré que l'oligosaccharide du lait LNFP III se lie au récepteur TLR4 des cellules dendritiques permettant leur maturation en phénotype 2 qui produisent les cytokines IL-4 et IFN- $\gamma$  permettant une réponse de type Th2.

#### F. Action indirecte sur la réponse immunitaire via la production de métabolites bactériens

Les effets des métabolites issus de la fermentation des MOs restent encore peu documentés. Bien que certains de ces composés aient été étudiés dans des contextes expérimentaux indépendants, ces travaux ne portaient pas spécifiquement sur leur production secondaire à l'ingestion de MOs.

##### 1. Les métabolites produits par la dégradation bactérienne

La fermentation des MOs par le microbiote intestinal entraîne la production de divers métabolites dont les AGCCs, des alcools et d'autres composés secondaires. Les études *in vivo* corrélient l'abondance des MOs avec celle des métabolites. La quantité d'acétate et de lactate est significativement plus élevée chez les nouveau-nés recevant des MOs par rapport à ceux recevant une préparation pour nourrissons standard à base de lait de vache (Bosheva et al., 2022). La fermentation *in vitro* d'un mélange de MOs par *Bifidobacterium* et *Bacteroides*

conduit à la production de lactate et d'AGCCs (Yu et al., 2013). Šuligoj et al. (2020) ont montré, dans un modèle *in vitro* reproduisant l'écosystème microbien du colon humain, que la fermentation du 2'-FL et du LNnT séparément induit une augmentation de la production d'acétate et de propionate puis, après trois semaines d'incubation, une augmentation de la production de butyrate. De même, à l'issue de la fermentation des MOs par *Akkermansia muciniphila*, des quantités importantes d'acétate, de propionate et de succinate sont retrouvées mais également du 1,2-propanediol lors de la croissance avec du 2'-FL (Kostopoulos et al., 2020). Ce dernier, précurseur du propionate, est également retrouvé après fermentation du 2'-FL et 3-FL par *Bifidobacterium kashiwanohense* et *Bifidobacterium breve* conjointement à la production de lactate, d'acétate et de formate (James et al., 2019). Une différence dans les métabolites produits a tout de même été observée selon la structure de MOs fermentés. Ainsi la fermentation des MOs sialylés augmente la concentration du propionate (Perdijk et al., 2019), tandis que la fermentation des MOs fucosylés et neutres résulte en une plus forte augmentation de lactate (Li et al., 2022b). Enfin, certains métabolites produits dans les modèles de culture *in vitro* ne sont pas les produits finaux retrouvés *in vivo* puisqu'ils peuvent être utilisés par d'autres bactéries. Ainsi le 1,2-propanediol, produit par la fermentation des MOs fucosylés, peut être utilisé par *Eubacterium hallii* ou *Limosilactobacillus reuteri* notamment, pour produire du propionate (Schwab et al., 2017; Cheng et al., 2020a). Les métabolites bactériens influencent la physiologie de l'épithélium intestinal, notamment en modulant la perméabilité et les voies de signalisation cellulaire. Ainsi les principaux mécanismes décrits pour l'action des AGCCs sont l'inhibition de l'histone désacétylase (HDAC), influençant de fait la régulation des gènes ainsi que l'interaction avec les récepteurs couplés aux protéines G (GPRs) GPR109A, GPR41 et GPR43, entraînant une modulation de la production de cytokines et un effet anti-inflammatoire (Figure 23) (Brown et al., 2003).

## 2. Les effets des métabolites sur l'épithélium

Certains métabolites décrits dans le paragraphe précédent ont montré des effets positifs sur l'épithélium intestinal. Les métabolites produits à l'issue de la fermentation du 2'-FL seul ou de 2'-FL et LNnT, dans un modèle *in vitro* reproduisant l'écosystème microbien du colon humain, réduisent la perméabilité des cellules Caco-2. Dans ce même modèle, une augmentation significative de l'expression du gène codant pour la protéine de jonctions serrées, Claudine 8, a été observée (Šuligoj et al., 2020). De même l'exposition *in vivo* de souris axéniques aux AGCCs permet d'augmenter la prolifération et le renouvellement des cellules épithéliales intestinales, considérablement réduits en l'absence de microbiote. Ce phénomène s'expliquerait par la capacité des AGCCs à réguler l'expression de certains gènes du métabolisme énergétique, comme démontré dans des organoïdes intestinaux murins (Park et al., 2016). Le butyrate induirait l'expression des gènes encodant les protéines de jonctions serrées, renforçant la barrière épithéliale (Figure 23). Ainsi, le butyrate a réduit la perméabilité des lignées cellulaires épithéliales intestinales porcine IPEC-J2 dans un état inflammatoire, par

exposition au LPS (Yan and Ajuwon, 2017). Le propionate et l'acétate stimuleraient également la barrière épithéliale. Ils peuvent en effet atténuer la diminution de la résistance électrique transépithéliale (TEER pour transepithelial electrical resistance) et l'augmentation de la perméabilité paracellulaire induites par le LPS dans les cellules Caco-2, tout en augmentant l'expression des protéines de jonctions serrées, suggérant un effet protecteur sur l'intégrité de la barrière épithéliale (Figure 23) (Feng et al., 2018). Le lactate pourrait également restaurer la barrière épithéliale après une altération en se liant au récepteur GPR81, inhibant la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. Dans un modèle de lignée cellulaire IEC stimulée avec TNF- $\alpha$  pour mimer une inflammation, le lactate a augmenté l'expression des protéines de jonctions serrées (Li et al., 2024). Enfin, dans leur étude Schalich et al. (2024) se sont intéressés aux effets de la vitamine B5, dont une forme a été produite après consommation de 2'-FL par *Bifidobacterium infantis*, dans un modèle *in vitro* de lignées cellulaires Caco-2 et YAMC, dérivée du côlon de souris adulte. Ce métabolite a permis de réduire la perméabilité intestinale et de limiter l'impact de l'agent oxydant peroxyde d'hydrogène sur les jonctions serrées.

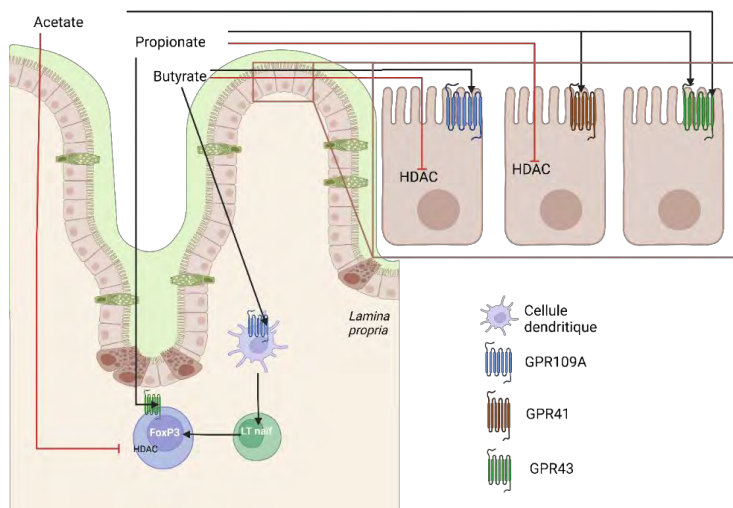


Figure 23 : Mécanismes d'action des acides gras à chaînes courtes (AGCCs) sur les cellules épithéliales et immunitaires de l'intestin. Le propionate et le butyrate ont la capacité d'inhiber l'HDAC des cellules épithéliales tandis que l'acétate inhibe cette enzyme dans les cellules immunitaires. L'acétate, le propionate et le butyrate activent les GPR des cellules épithéliales et immunitaires, à l'origine de la régulation de voies de signalisation. GPR : récepteur couplé aux protéines G ; HDAC : histone désacétylase ; LT : lymphocyte T. Figure créée avec Biorender, adaptée de Koh et al. (2016).

### 3. Les effets des métabolites sur la réponse immunitaire

Certains métabolites exercent également un rôle immunomodulateur. Le butyrate pourrait réduire la production des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-12 par inhibition de l'HDAC comme cela a été montré dans des macrophages isolés de la *lamina propria* de colon murin stimulés au LPS (Figure 23) (Chang et al., 2014). De même, les surnageants issus de la fermentation du 2'-FL ou de LNnT réduisent la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 dans les cultures de cellules Caco-2, suggérant un effet anti-inflammatoire direct sur l'épithélium intestinal des métabolites microbiens produits, bien que ces derniers n'aient pas

été identifiés individuellement (Šuligoj et al., 2020). En inhibant l'HDAC des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, le butyrate et le propionate régulent à la hausse le gène FOXP3, à l'origine d'une différenciation en lymphocytes T régulateurs (Arpaia et al., 2013). L'acétate pourrait également orienter la différenciation des lymphocytes T vers un phénotype régulateur. Cet AGCC augmenterait le taux d'acétyl-CoA, un métabolite intermédiaire, ce qui entrainerait l'acétylation de la protéine glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), une enzyme impliquée dans plusieurs réactions biochimiques dont la glycolyse aérobie qui peut induire une différenciation plus importante des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en phénotype Th1 (Jing et al., 2023). Enfin, le rôle exact du succinate est peu défini, mais il semblerait qu'il joue un rôle dans l'immunité par activation du récepteur GPR91, présent sur les cellules dendritiques, à l'origine d'une production accrue de cytokines pro-inflammatoires, augmentant de fait la réponse des lymphocytes T. Ces effets ont cependant lieu à des doses importantes, non rencontrées physiologiquement chez des individus sains (Rubic et al., 2008).

Les oligosaccharides du lait exercent donc de multiples fonctions sur les différentes composantes de la barrière intestinale, l'épithélium, les cellules immunitaires et sur le microbiote de l'hôte (Figure 24). Comme le montrent les expérimentations, ces effets dépendent étroitement de la structure des oligosaccharides du lait considérés. Néanmoins, les études ciblant les effets spécifiques de structures particulières d'oligosaccharides du lait sur le microbiote et la réponse immunitaire intestinale font défaut chez nos espèces cibles, le porcelet et le lapereau. Par ailleurs, les travaux ayant évalué l'impact direct des métabolites dérivés de la fermentation des oligosaccharides du lait par les bactéries commensales sur les cellules immunitaires de ces mêmes hôtes restent limités.

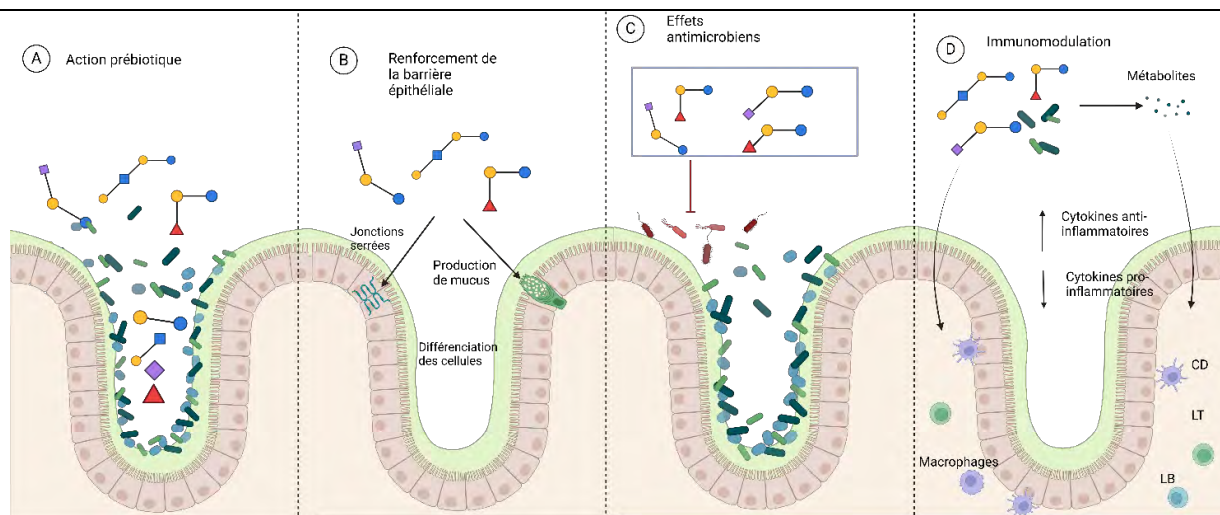


Figure 24 : Rôle des oligosaccharides du lait sur la santé. (A) Les MOs peuvent être dégradés par certaines bactéries commensales. (B) Les MOs renforcent la barrière épithéliale en favorisant la production de mucus, l'expression des protéines de jonctions serrées et la différenciation des cellules épithéliales (C) Les MOs empêchent l'adhésion des pathogènes en se liant à ces derniers ou en se liant aux récepteurs de l'épithélium, empêchant les pathogènes de coloniser l'épithélium. La croissance des bactéries commensales favorisée par les MOs permet également de limiter la colonisation par les pathogènes. (D) Les MOs régulent l'immunité intestinale de façon directe, en se fixant sur certaines cellules immunitaires, enclenchant des voies de régulation, ou indirecte, par le biais des métabolites produits à l'issue de la fermentation des MOs par les bactéries. CD : Cellules dendritiques ; LB : Lymphocytes B ; LT : lymphocytes T. Figure créée sur Biorender, adaptée de Sun et al. (2025).

## Chapitre 4 Utilisation des oligosaccharides du lait pour promouvoir la santé

---

Le sevrage constitue une étape critique du développement des mammifères, marqué par des changements alimentaires et environnementaux majeurs. Cette transition s'accompagne fréquemment de troubles digestifs, dont l'incidence est particulièrement élevée en élevage porcin et cunicole. Dans ce chapitre nous explorerons ces problématiques spécifiques et les stratégies visant à mieux préparer les jeunes animaux au sevrage. L'accélération du développement de la barrière intestinale apparaît comme un levier clé pour limiter les déséquilibres digestifs associés à cette période. Parmi les approches envisagées, la modulation de ces barrières par les oligosaccharides du lait représente une piste prometteuse, ouvrant la voie à des stratégies nutritionnelles innovantes.

### I. Le sevrage, une période de sensibilité accrue en élevage

Le sevrage marque la fin de l'alimentation lactée, très digestible, et le passage à un régime exclusivement solide complexe, tout en s'accompagnant d'une séparation physique d'avec la mère et d'un changement d'environnement (Lallès et al., 2007). Ces bouleversements, tant nutritionnels que sociaux et environnementaux, rendent cette période particulièrement critique pour le développement et la santé des jeunes.

#### A. Le sevrage en élevages porcins et cunicoles, une période de troubles digestifs

##### 1. Un sevrage précoce en élevage

Dans les élevages, le sevrage intervient généralement plus tôt qu'en condition de semi-liberté, principalement pour des raisons économiques. Chez le porc, cette différence est particulièrement marquée, en condition de semi-liberté, le sevrage est un processus progressif qui s'étend entre 15 et 22 semaines d'âge (Jensen and Stangel, 1992), tandis qu'en élevage, il est abrupt et survient entre 21 et 28 jours d'âge (Moeser et al., 2017). Chez le lapin, l'écart est moins important, les lapereaux sont généralement sevrés entre 30 et 35 jours d'âge en élevage (Bivolarski and Vachkova, 2014), contre 28 à 42 jours d'âge en condition de semi-liberté (Gidenne et al., 2020a). Ainsi, si le sevrage est précoce en élevage porcin, il demeure plus proche du rythme physiologique en élevage cunicole. Chez le lapin, l'introduction de l'aliment solide débute dès 18 jours d'âge, à raison de 10 à 25 g par jour par lapereaux. A partir de 4 semaines d'âge, cette part excède la quantité de lait ingérée (Gidenne and Fortun-Lamothe, 2002), ce qui facilite l'adaptation post-sevrage. A l'inverse, les porcelets n'ingèrent que très peu d'aliments solides en amont du sevrage, ce qui accentue l'impact du changement alimentaire brutal (Heo et al., 2018).

Cette période critique favorise l'apparition de troubles digestifs sévères. Chez les lapereaux, les affections digestives surviennent majoritairement dans les deux semaines suivant le sevrage et s'accompagnent de diarrhées dans 95% des cas (Licois and Marlier, 2008). Une

étude menée par l'ITAVI en 2022 sur 417 exploitations cynicoles a rapporté un taux de mortalité global de 26 % entre la naissance et la vente, dont 8 % survenant en période post-sevrage (Pedro and Fourdin, 2024). Chez les porcelets, la mortalité liée aux diarrhées post-sevrage est autour de 2 %, mais induit des ralentissements de croissance, à l'origine de pertes économiques (Le Floc'h et al., 2021).

La complexité de ces troubles digestifs réside dans leur origine multifactorielle, impliquant à la fois l'état physiologique de l'animal, la présence d'agents pathogènes et divers facteurs environnementaux (Gidenne et al., 2020b).

## 2. Des causes multifactorielles aux troubles digestifs

Les diarrhées post-sevrage résultent d'un déséquilibre entre les mécanismes d'absorption et de sécrétion de fluides et électrolytes au niveau de l'épithélium intestinal (Thiagarajah et al., 2015). Chez les porcelets, l'infection par *E. coli* entérotoxigéniques (ETEC) constitue la principale cause de diarrhée post-sevrage (Nagy and Fekete, 2005). Ces bactéries adhèrent à la muqueuse épithéliale et libèrent des toxines perturbant l'équilibre hydrique et électrolytique de l'épithélium, entraînant une hyper-sécrétion et une diminution de l'absorption des fluides (Rhouma et al., 2017). Chez les lapereaux, les troubles digestifs peuvent être liés à des agents pathogènes identifiés, tels que des parasites comme les coccidies, des bactéries telles que les *E. coli* ou *Clostridium piliforme* et *Clostridium spiroforme*, ainsi que par des virus tels que les rotavirus et les coronavirus (Marlier et al., 2003; Licois and Marlier, 2008). Toutefois, pour d'autres pathologies telles que l'entéropathie épizootique du lapin (Epizootic Rabbit Enteropathy ERE) (Licois et al., 2005), l'étiologie reste encore inconnue à ce jour. L'arrêt de l'ingestion lactée entraîne la fin de l'immunité passive fournie par le lait maternel, le nouveau-né n'a plus accès aux composés immunomodulateurs du lait alors même que les barrières intestinales des animaux sont encore en développement (Moeser et al., 2017).

Indépendamment du pathogène impliqué, les troubles digestifs post-sevrage résultent de conditions physiologiques qui favorisent l'implantation des agents pathogènes (Gidenne et al., 2010). Le stress lié à la séparation d'avec la mère, le changement d'environnement et le mélange avec d'autres individus contribuent à un déséquilibre physiologique marqué (Gresse et al., 2017). Les taux de cortisol et de corticolibérine augmentent significativement chez les animaux sevrés et peuvent rester élevés jusqu'à sept jours après le sevrage (Moeser et al., 2007; Salak-Johnson and McGlone, 2007; Gharib et al., 2018). Par ailleurs, la transition alimentaire brutale constitue un facteur aggravant. Le passage d'un aliment lacté hautement digestible à une alimentation végétale plus complexe peut entraîner une période d'anorexie et modifier la physiologie intestinale (Rhouma et al., 2017). A ce stade, l'activité enzymatique digestive est encore incomplète, cette dernière étant optimale autour de 45-50 jours d'âge chez les lapereaux et 2 mois d'âge chez les porcelets (Manners, 1976; Debray et al., 2002; Wang et al., 2016). L'alimentation des porcelets peut exacerber ces déséquilibres : les

protéines non digérées atteignent l'intestin distal, où elles sont fermentées par le microbiote, entraînant une forte concentration d'ammoniaque. Cet excès d'ammoniaque augmente le pH intestinal, créant un environnement propice à la prolifération de pathogènes (Tang et al., 2024). Ces altérations physiologiques et métaboliques favorisent une dysbiose intestinale sévère, accompagnée d'une altération de la fonction barrière de l'épithélium, exacerbant ainsi la susceptibilité aux infections et aux désordres digestifs post-sevrage.

Le sevrage entraîne ainsi des altérations majeures de l'intégrité intestinale, qui se traduisent par des modifications morphologiques et fonctionnelles (Figure 25). Chez les porcelets, dans les 3 à 7 jours suivant le sevrage, la taille des villosités intestinales est réduite, avec un rétablissement progressif après 14 jours post-sevrage dans le jéjunum (Boudry et al., 2004; Hu et al., 2013). Ces perturbations s'accompagnent d'une diminution de la prolifération des cellules intestinales et d'une altération des barrières chimiques, notamment avec une baisse de l'expression des Muc2 (Yang et al., 2016). Parallèlement, la perméabilité intestinale augmente, comme l'indique la réduction significative de la résistance électrique transépithéliale (TEER) du jéjunum et du côlon, favorisant ainsi l'invasion par des pathogènes (Moeser et al., 2007).

L'impact du sevrage sur l'immunité intestinale est également notable. Le système immunitaire n'est pas totalement mature au moment du sevrage, le développement complet ayant lieu autour de 7 semaines d'âge pour le porcelet et 6-8 semaines d'âge pour les lapereaux, rendant les individus particulièrement vulnérables (Stokes et al., 2004; Lamothe et al., 2015). Une régulation à la hausse des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  et IL-8 est observée, indiquant un état inflammatoire de l'intestin chez le porcelet (Groot et al., 2021). De même, le nombre de mastocytes et de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques est augmenté (Pohl et al., 2017; Cao et al., 2022). Cette inflammation exacerbe la perméabilité intestinale, augmentant ainsi le risque d'infection. De même, chez le lapin, le stress du sevrage entraîne une dégradation transitoire de la morphologie de l'épithélium, aggravant la fragilité digestive (Gallois et al., 2005). L'arrêt de l'alimentation lactée impacte également la prolifération des cellules épithéliales, probablement en raison de l'absence des hormones de croissance présentes dans le lait (Beaumont et al., 2021). Par ailleurs, l'introduction d'aliments solides entraîne une diminution de l'expression des protéines de jonctions, bien que cela ne se traduise pas immédiatement par une augmentation de la perméabilité intestinale (Beaumont et al., 2020).

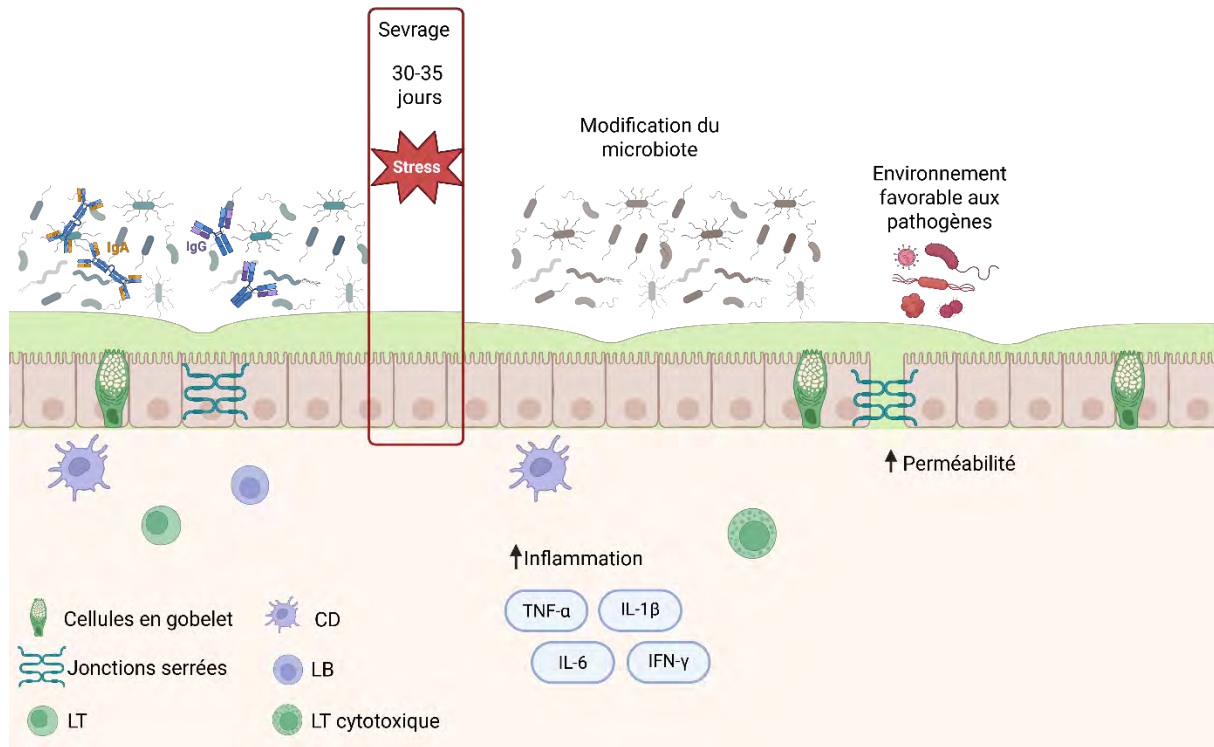


Figure 25 : Conséquences du sevrage sur la physiologie intestinale. Avant le sevrage, les individus connaissent d'importants changements, les structures épithéliales, le système immunitaire et le microbiote se mettent en place progressivement. L'immunité passive transmise par le lait maternel est primordial. Le sevrage induit un stress important. En parallèle l'épithélium et les systèmes digestifs et immunitaires ne sont pas totalement développés, limitant les capacités d'adaptation des individus à ce changement important. L'intestin est en état d'inflammation, les barrières sont dégradées, facilitant la colonisation par les pathogènes. Le taux de diarrhées est donc important autour du sevrage, entraînant le recours aux antibiotiques, dont l'utilisation importante est à l'origine d'un phénomène d'antibiorésistance. CD : cellule dendritique, LB : lymphocyte B ; LT : lymphocyte T. Figure créée avec Biorender.

## B. Fenêtre d'opportunité pour optimiser la maturation de la barrière intestinale

Au début de la vie, le microbiote intestinal est en pleine construction, contrairement à l'âge adulte où la communauté se stabilise (Torow and Hornef, 2017). Cette période précoce représente donc une phase clé pour moduler la composition et le développement du microbiote intestinal.

Les études sur les animaux axéniques montrent que l'absence de colonisation bactérienne entraîne une immaturité des structures épithéliales et du système immunitaire (I.D.3). De plus, la colonisation bactérienne tardive, après le sevrage, ne permet pas de restaurer complètement ces déficits (Olszak et al., 2012; Al Nabhani et al., 2019). Par exemple, chez les souris axéniques atteintes de colites, une exposition bactérienne avant le sevrage conduit à une forme plus bénigne de la maladie, tandis qu'une exposition après le sevrage entraîne des formes plus sévères, avec une dérégulation importante des cytokines inflammatoires (Al Nabhani et al., 2019).

Ces observations ont conduit au concept de réaction au sevrage (« weaning reaction »), défini par (Al Nabhani et al., 2019) comme la réponse immunitaire spécifique déclenchée par

l'établissement du microbiote au moment du sevrage. Chez la souris, cette réaction a lieu entre 3 et 4 semaines après la naissance, et son absence augmente la susceptibilité aux pathologies inflammatoires. Ce processus est déclenché par les antigènes et métabolites bactériens qui favorisent le développement des lymphocytes T régulateurs, modulant ainsi la réponse immunitaire (Al Nabhani et al., 2019). L'exposition aux bactéries est facilitée par la diminution des facteurs de croissance épidermique (EGF pour epidermal growth factors) du lait, protéine qui stimule la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales, et par l'activation de passages transépithéliaux via les cellules caliciformes, permettant aux antigènes luminaux d'atteindre la *lamina propria* (Knoop et al., 2017). Toutefois, les mécanismes qui marquent la fin de cette fenêtre d'opportunité restent inconnus.

La durée de cette fenêtre de plasticité varie selon les espèces et ne dépend pas directement de la consommation de lait (Al Nabhani et al., 2019). Elle est marquée par une co-maturation du microbiote, de l'épithélium intestinal et du système immunitaire, influencée par des facteurs nutritionnels et endogènes, avec des conséquences durables sur la santé (Torow and Hornef, 2017; Al Nabhani et al., 2019). Chez le porc, cette fenêtre d'opportunité pour le développement du système immunitaire s'étend entre 14 et 30 jours d'âge, période durant laquelle la communauté microbienne reste dynamique et plus facilement modulable (Thompson et al., 2008). Chez le lapin, Combes et al. (2011) ont noté d'importantes fluctuations de la composition microbienne caecale jusqu'à 49 jours d'âge, suggérant une période de plasticité prolongée.

Ainsi, exploiter cette fenêtre critique via des stratégies nutritionnelles adaptées représente une approche préventive prometteuse pour limiter les troubles digestifs liés au sevrage et renforcer la résilience du microbiote intestinal.

### C. Stratégies alternatives à l'antibiothérapie pour préserver la santé du jeune animal en élevage

Avant 2006, l'utilisation des antibiotiques en prévention des troubles digestifs et comme promoteur de croissance était autorisée en union européenne. Les bactéries possèdent la capacité de développer des résistances face aux antibiotiques, cette sélection des bactéries résistantes a été grandement accélérée par l'utilisation massive et inappropriée des antibiotiques chez l'homme et en agriculture (Morehead and Scarbrough, 2018). Un rapport de l'organisation mondiale de la santé (OMS) considère la résistance aux antimicrobiens comme une menace mondiale (World Health Organization, 2022). L'ANSES a mis en avant le fait que les élevages cynicoles sont particulièrement utilisateurs d'antibiotiques (Marlier et al., 2003). En 2023, l'exposition aux antibiotiques des filières cynicoles et porcines avait diminué de 54 et 64 % respectivement par rapport à 2011, mais ces deux filières restent tout de même les deux filières d'élevage les plus exposées aux antibiotiques (Tableau 8) (Anses, 2024).

Tableau 8 : Appréciation du niveau d'exposition aux antibiotiques (ALEA pour Assessment of the Level of Exposure to Antibiotics) des espèces monogastriques d'élevage en 2023 d'après les données de l'Anses (2024).

	Porcs	Volailles	Lapins
ALEA	0.392	0.328	1.451

Les alternatives aux antibiotiques visent à renforcer les défenses intestinales des jeunes animaux avant le sevrage afin de limiter les troubles digestifs. Plusieurs études ont montré que la période d'introduction de l'aliment solide dans le régime alimentaire impacte fortement le microbiote, en fournissant à ce dernier des substrats différents de ceux fournis par le lait (Bian et al., 2016). Ainsi, l'introduction précoce d'aliments solides favorise la maturation du microbiote et la mise en place des barrières intestinales. Chez le porcelet, le creep-feed, aliment disponible pour le porcelet allaité, a montré des capacités à réduire la prévalence des diarrhées chez les porcelets en post-sevrage (Yan et al., 2011). Ce dernier étant cependant consommé par seulement 40 à 60 % des porcelets (Sulabo et al., 2010), il peut être remplacé par un complément d'aliment d'allaitement liquide (de Greeff et al., 2016; Hu et al., 2020). Ces derniers améliorent la structure intestinale et module favorablement le microbiote, en accélérant sa maturation (Schokker et al., 2018; Tian et al., 2018; Choudhury et al., 2021). Chez le lapin, un aliment riche en fibres rapidement fermentescibles stimule la fermentation caecale et améliore la résistance aux infections (Gidenne and Licois, 2005; Mattioli et al., 2019; Paës et al., 2022).

L'apport de prébiotiques, substrats utilisés sélectivement par des microorganismes de l'hôte, conférant des bénéfices pour la santé de l'hôte (Gibson et al., 2017), chez le porcelet et le lapereau module favorablement le microbiote, réduit l'inflammation intestinale et diminue l'abondance d'*Enterobacteriaceae* pathogènes (Li et al., 2018; Jin et al., 2020). Les probiotiques, quant à eux, préparation contenant des microorganismes connus et viables qui altèrent le microbiote de façon transitoire et exerce ainsi des effets bénéfiques pour la santé de l'hôte (Schrezenmeir and de Vrese, 2001), favorisent l'élimination d'*E. coli* pathogènes et réduisent les diarrhées post-sevrage chez les porcelets (Xin et al., 2020; Hansen et al., 2022).

Ces stratégies montrent qu'une alimentation adaptée avant le sevrage influence positivement la mise en place des défenses intestinales, en accélérant la maturation des différentes barrières de la muqueuse épithéliale. Ceci permet de préparer le jeune aux stress et changements du sevrage. Pour cela, le choix des substrats et leur distribution au cours de la fenêtre d'opportunité apparaissent comme des facteurs clés de réussite.

Au vu des constats précédents concernant la permissivité du microbiote au début de la vie des porcelets et lapereaux et les effets bénéfiques des oligosaccharides du lait (II), une supplémentation avec ces MOs avant le sevrage apparaît comme une stratégie prometteuse pour prévenir les troubles digestifs en élevage.

## II. Potentiels d'utilisation des oligosaccharides du lait pour piloter la santé en amont du sevrage

### A. Disponibilité des oligosaccharides du lait

Les différences observées entre le microbiote des enfants allaités et celui des enfants nourris aux formules infantiles ont conduit au développement de formules enrichies en oligosaccharides (Vandenplas, 2002). En pratique, ces formules sont le plus souvent supplémentées avec d'autres types d'oligosaccharides, tels que les fructooligosaccharides (FOS), polymères de fructose, et les galactooligosaccharides (GOS), polymères de galactose. Cependant, ces composés sont présents en quantités minimales dans le lait humain et n'offrent pas les mêmes fonctions que les MOs (Faijes et al., 2019; Eussen et al., 2021). Ainsi, la synthèse de MOs représente un axe de recherche majeur, avec le développement de plusieurs méthodes telles que l'isolement à partir de laits de mammifères ainsi que des techniques chimiques, enzymatiques ou d'ingénierie bactérienne.

L'isolement des MOs à partir du lait humain garantit une composition proche de celle rencontrée physiologiquement, mais cette source reste d'accès limité. À l'inverse, l'isolement à partir de laits d'animaux d'élevage est plus accessible, bien que la concentration en MOs y soit plus faible et que les profils de MOs diffèrent de ceux du lait humain (I) (Barile et al., 2009). Une approche consiste à utiliser le lactosérum, co-produit de l'industrie fromagère, qui contient des MOs. Bien que les procédés technologiques soient déjà disponibles, la pureté des MOs demeure difficile à maîtriser en raison de la présence d'autres sucres du lait, tels que le lactose, le glucose et le galactose (Thum et al., 2015a).

La synthèse des MOs reste limitée par la complexité des étapes, le coût élevé et la disponibilité restreinte des substrats ou des sucres nucléotides nécessaires à leur synthèse. Les approches par fermentation utilisant des bactéries génétiquement modifiées, comme *E. Coli* ou *B. subtilis*, permettent une production plus intégrée, mais nécessitent une purification rigoureuse avant toute application, notamment en raison de l'usage d'organismes génétiquement modifiés (OGM) (Baumgartner et al., 2013; Chen, 2015; Bode et al., 2016; Frohnmeyer and Elling, 2023).

A ce jour, les méthodes disponibles ne permettent pas encore de synthétiser des MOs aux structures complexes et restent limitées aux MOs de petite taille (Chouraqui, 2021).

### B. Bénéfices d'une supplémentation avec des oligosaccharides du lait

Les effets d'une supplémentation en MOs ont été étudiés chez l'humain, ainsi que sur des modèles murins et porcins, mais aucune étude n'a encore été réalisée chez les lapins. Les résultats obtenus sont prometteurs pour la santé des nouveau-nés. Par exemple le microbiote des enfants nourris avec une formule infantile enrichie en 2'-FL et LNnT pendant 6 mois se rapproche davantage de celui des enfants allaités, comparé à celui des enfants recevant une formule non supplémentée en MOs. Cependant, cette différence n'est plus significative à 12

mois d'âge (Berger et al., 2020). Des effets similaires ont été observés avec des formules enrichies en 2'-FL, DFL, LNT, 3'-SL et 6'-SL. Les enfants supplémentés présentaient une proportion plus élevée de *Bifidobacterium* et une réduction de *Clostridium difficile*. De plus, les concentrations d'acétate et de lactate étaient supérieures chez ces enfants (Bosheva et al., 2022). De même, les *Bacteroides* dominent dans le microbiote du nouveau-né lorsque le lait maternel est riche en MOs acides (Borewicz et al., 2019) mais également chez les nouveau-nés dont 2'-FL, LNFP I, II, III, V et pLNH, présents dans le lait de la mère, ne sont pas retrouvés dans les fèces, indiquant une possible dégradation par ces bactéries (Borewicz et al., 2020). Le type de structure de MOs supplémentés pourrait orienter le type de bactéries du microbiote. Le lait des mères de types sécréteurs, possédant le gène FUT2 capable de synthétiser des MOs  $\alpha$ -1,2 fucosylés, entraîne une dominance de *Bifidobacterium* et *Bacteroides* dans le microbiote des enfants allaités (Lewis et al., 2015). La supplémentation en MOs a également montré des effets bénéfiques sur la réponse immunitaire. Par exemple, l'ajout de 2'-FL dans les formules infantiles a permis de réduire les taux sanguins des cytokines pro-inflammatoires IL-1RA, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$ , les rapprochant des taux observés chez les enfants allaités, contrairement aux formules supplémentées en GOS (Goehring et al., 2016). Ces premiers résultats cliniques suggèrent que l'ajout de MOs dans les formules infantiles permet de mimer certains effets bénéfiques de l'allaitement.

Chez les porcelets, la supplémentation en MOs a également donné des résultats encourageants. L'administration d'un aliment d'allaitement enrichi en 2'-FL, de l'âge de 2 à 34-35 jours, a modifié le microbiote du colon et augmenté significativement la concentration en acétate (Wang et al., 2025). De plus, le 2'-FL favoriserait la maturation de l'épithélium intestinal, comme en témoigne l'augmentation de la surface des cryptes iléales et des taux de sucrase chez les porcelets supplémentés (Daniels et al., 2022). Par ailleurs, l'ajout d'un mélange de 2'-FL, LNnT, 6'-SL, 3'-SL a permis de réduire la durée de la diarrhée chez des porcelets infectés avec un rotavirus (Li et al., 2014). Enfin, la distribution de sialyllactoses dilués dans l'eau, via des tétines artificielles, en complément du lait de truie, a réduit les taux de cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$ , augmenté les tailles des villosités, les protéines de jonctions serrées, l'activité des enzymes digestives lactase et sucrase et la prolifération des cellules épithéliales intestinales du jéjunum. Le microbiote des porcelets supplémentés présentait également des proportions plus élevées de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* dans le colon, ainsi qu'une concentration accrue de butyrate. Ces observations suggèrent un potentiel développement favorable de la muqueuse intestinale et une potentielle modulation de la composition du microbiote par les MOs (Li et al., 2022a).

### III. Outils pour l'étude de la relation structure fonction des oligosaccharides du lait

Les expérimentations *in vivo* sur les animaux représentent un pilier de la recherche, mais les préoccupations éthiques croissantes ont conduit à l'adoption des principes des 3R –

Remplacer, Réduire et Raffiner – proposés par Russel and Burch (1959). Ces principes visent à limiter l'utilisation des animaux tout en optimisant les résultats scientifiques : en remplaçant les modèles animaux par des méthodes alternatives comme les modèles *in vitro*, en réduisant le nombre d'animaux nécessaires grâce à l'amélioration de l'efficacité des protocoles, et en raffinant les procédures pour minimiser la souffrance des animaux (Gennari et al., 2005). Dans ce contexte, l'application des principes des 3R justifie l'utilisation fréquente de modèles *in vitro*, qui offrent une alternative plus éthique, bien qu'utilisant tout de même des animaux pour les expérimentations, et contrôlable pour l'étude des interactions entre les oligosaccharides du lait, le microbiote et le système immunitaire intestinal.

Dans cette partie, nous décrirons les principaux modèles *in vitro* disponibles pour étudier le microbiote et le système immunitaire, avec une attention particulière portée aux études sur les MOs.

#### A. Outils pour l'étude des mécanismes d'action de composés alimentaires sur les bactéries du microbiote

##### 1. La culture de bactéries, un outil clé pour les études fonctionnelles

Les cultures bactériennes représentent un outil essentiel pour analyser l'effet des MOs sur le microbiote. Elles permettent d'évaluer avec précision la croissance bactérienne, la production de métabolites et les interactions spécifiques (Fleming et al., 2021). Toutefois, les méthodes actuelles ne permettent pas de cultiver toutes les espèces, soulignant la nécessité de développer de nouvelles approches pour l'isolement et la caractérisation de souches encore inconnues (Song et al., 2024). Par exemple, Wylensek et al. (2020) ont mené un projet d'isolement de bactéries issues de l'intestin de porc et ont constaté que les études sur les bactéries cultivables de cet environnement sont encore rares. Grâce à la culturomique, ils ont identifié 38 nouveaux taxons, démontrant l'existence d'une diversité bactérienne encore faiblement caractérisée chez le porc.

L'analyse des cultures bactériennes en présence de MOs permet notamment de comparer les profils de croissance de différentes espèces (Marcobal et al., 2010; Yu et al., 2013; Thongaram et al., 2017; Salli et al., 2021). Il a ainsi été démontré que des souches appartenant à la même espèce peuvent présenter des capacités variées dans l'utilisation des MOs comme observé pour *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (Shani et al., 2022). La majorité des recherches portant sur les effets des MOs sur le microbiote utilisent des souches de collection (Marcobal et al., 2010; Schwab and Gänzle, 2011; Yu et al., 2013; Thongaram et al., 2017; Gotoh et al., 2018; Salli et al., 2021). L'essor des infrastructures d'archivage facilite l'accès à ces souches, permettant aux chercheurs de mener des études sans nécessiter l'isolement préalable (Lagkouvardos et al., 2017).

## 2. L'isolement de bactéries à partir des individus cibles

L'isolement de bactéries directement à partir des espèces étudiées offre l'avantage de disposer de souches représentatives du microbiote cible. Cet isolement est généralement réalisé à partir des fèces, mais peut également provenir directement des tissus concernés, offrant ainsi une image fidèle de la composition microbienne (Moote et al., 2021). Toutefois, ces méthodes plus invasives sont moins couramment employées. L'isolement s'effectue dans des conditions anaérobies et peut être orienté par des milieux sélectifs favorisant certaines souches spécifiques (Lawson et al., 2020). Ruiz-Moyano et al. (2013) ont par exemple utilisé un milieu sélectif pour isoler des *Bifidobacterium*, obtenant 461 isolats parmi lesquels *B. breve*, la plus fréquente dans le microbiote des nouveau-nés allaités et reconnue pour sa capacité à dégrader les MOs. Kijner et al. (2022a) ont quant à eux utilisé des milieux sélectifs pour les *Bacteroides*. Enfin, en utilisant une approche ciblée avec un milieu contenant de la mucine, Luna et al. (2022) ont pu étudier la croissance de différentes souches d'*Akkermansia*, espèce bactérienne consommatrice de mucine, en présence de MOs.

De plus, les techniques d'enrichissement, qui consistent à pré-incuber les échantillons dans des milieux liquides spécifiques avant l'isolement, augmentent la probabilité d'obtenir des taxons qui ne pourraient pas croître par une méthode d'ensemencement sur boîte (Clavel et al., 2017). Moote et al. (2021) ont ainsi montré que des stratégies d'enrichissement prolongé permettent d'isoler une diversité accrue de taxons intestinaux chez le porc. Par ailleurs, l'utilisation des MOs directement dans les milieux d'isolement permet d'orienter la sélection vers des souches capables de les dégrader. Par exemple, Akazawa et al. (2021) ont isolé des bactéries du côlon de rat en utilisant du 3'-SL comme unique source de carbone, ne récupérant que les souches capables de métaboliser ce composé.

Enfin, certains chercheurs optent pour des modèles utilisant le microbiote fécal total, permettant d'évaluer les effets des MOs dans des conditions plus proches de la physiologie intestinale (Perdijk et al., 2019; Rubio-Del-Campo et al., 2020). Cependant, ces modèles limitent l'identification précise des capacités des souches à dégrader individuellement les MOs.

## 3. Phénotypage des espèces bactériennes

Les techniques cultures dépendantes permettent également de phénotyper les bactéries capables de dégrader les MOs. Après croissance en présence de ces composés, il est possible de mesurer les variations de pH, les métabolites produits et les taux de MOs consommés (Marcobal et al., 2010; Yu et al., 2013; Thum et al., 2015b; Perdijk et al., 2019; Cheng et al., 2020b). L'un des avantages majeurs offerts par les cultures bactériennes est l'analyse des profils d'expression génique en phase de croissance. Le profil de transcription analysé par séquençage de l'ARN bactérien permet d'identifier les gènes sur-exprimés en présence de

MOs, révélant ainsi les mécanismes impliqués dans leur dégradation, notamment les glycosides hydrolases (GHs) (Marcobal et al., 2011; Garrido et al., 2015; Kijner et al., 2022a).

Il est également possible de séquencer le génome des souches afin d'inférer leurs capacités métaboliques en présence de MOs, en identifiant les gènes potentiellement impliqués dans leur dégradation. Cette approche permet de formuler des hypothèses sur les voies métaboliques mobilisées, qui pourront ensuite être confirmées par des expériences fonctionnelles, par exemple à l'aide de transcriptomique (Shani et al., 2022).

Cette approche combinant l'isolement, la culture et la caractérisation des souches bactériennes permet ainsi d'approfondir notre compréhension des interactions entre les MOs et le microbiote, ouvrant la voie à des applications ciblées pour moduler favorablement la composition bactérienne.

## B. Outils pour l'étude des mécanismes d'action de composés alimentaires sur la réponse immunitaire

La culture cellulaire permet la croissance de cellules dans des conditions contrôlées, en dehors de leur tissu d'origine. Cette technique est essentielle pour étudier les mécanismes de biologie cellulaire, tester la toxicité de certains produits ou encore les effets de composés bioactifs (Verma et al., 2020). Deux principales sources de cellules sont utilisées : les lignées cellulaires, dérivées de cellules cancéreuses immortalisées et disponibles commercialement, et les cultures primaires, dérivées de cellules isolées directement des tissus (Jalali et al., 2017). Après avoir présenté les différences entre ces deux types de modèles, nous aborderons les techniques couramment utilisées dans les études impliquant les MOs.

### 1. Différences entre lignées cellulaires et cultures primaires

Les lignées cellulaires sont dérivées de tumeurs ou immortalisées artificiellement, offrant l'avantage d'une culture prolongée jusqu'à 3 mois, une disponibilité permanente ainsi qu'une standardisation et reproductibilité accrues des expériences. Parmi les lignées immunitaires, on retrouve les THP1, dérivées de cellules leucémiques humaines ayant des caractéristiques de macrophages (Tsuchiya et al., 1980), les RAW 264.7, issues de tumeurs murines et présentant également des caractéristiques de macrophages (Raschke et al., 1978), et les U937, dérivées de leucémies humaines et représentatives des monocytes (Sundström and Nilsson, 1976). Cependant, ces lignées manquent d'hétérogénéité et ne reflètent pas fidèlement la physiologie immunitaire de l'hôte (Chanput et al., 2015).

A l'inverse, les cultures de cellules primaires, directement isolées des tissus ou du sang des animaux ou humains, offrent une meilleure représentativité des réponses immunitaires spécifiques de l'hôte. Toutefois, elles présentent des limites en termes de durée de viabilité, de disponibilité et sont influencées par une variabilité interindividuelle liée à des facteurs endogènes (génétique, alimentation, hormones, infections, environnement, ...), rendant nécessaire l'utilisation de plusieurs individus (Kleiveland, 2015). Les études sur les MOs ont

majoritairement recours à des cultures primaires, notamment des PBMCs, bien que certaines aient utilisé des lignées comme RAW264.7 (Zhang et al., 2019a; Tang et al., 2025) et THP-1 (Kim et al., 2018; Abou Assale et al., 2023).

## 2. Importance de l'origine des cellules isolées

On distingue les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs pour peripheral blood mononuclear cells) et les cellules mononuclées de la *lamina propria* (LPMCs pour *lamina propria* mononuclear cells). Les PBMCs sont facilement accessibles puisqu'un échantillon de sang suffit, tandis que l'isolement des LPMCs nécessite un accès au tissu intestinal. Cependant, ces deux populations cellulaires présentent des phénotypes cellulaires distincts, influençant potentiellement leurs réponses aux MOs. Burke Schinkel et al. (2024) ont comparé des PBMCs avec des cellules immunitaires du colon chez des patients humains sains et ont mis en évidence des différences significatives en termes de proportion, de phénotypes, d'expression de marqueurs de surface et de production de cytokines (Figure 26). Ainsi, la majorité des lymphocytes T présents dans les PBMCs sont des cellules naïves, alors que ceux isolés de l'intestin arborent principalement un phénotype mémoire. De même, la proportion de cellules capables de produire des cytokines est nettement plus élevée parmi les LPMCs (Burke Schinkel et al., 2024). Ces différences phénotypiques suggèrent que selon l'origine des cellules – sang périphérique ou *lamina propria* – les réponses immunitaires aux MOs pourraient être variables (Kleiveland, 2015).

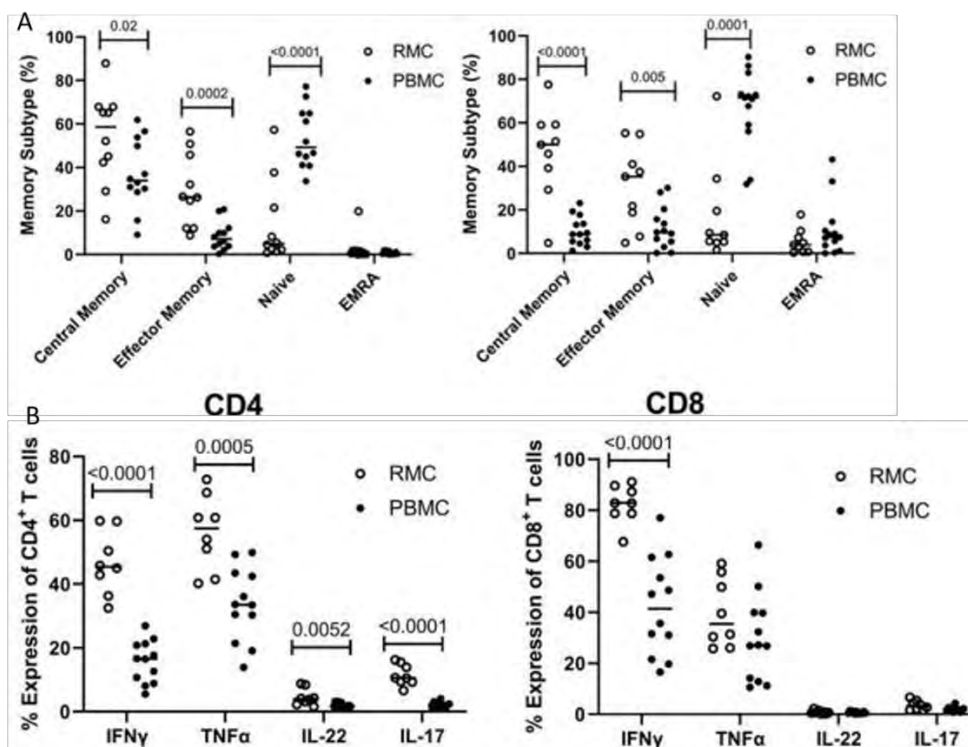


Figure 26 : Comparaison des cellules mononuclées du sang périphérique et du côlon recto-sigmoïde (A) phénotypes mémoires des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (B) expression de cytokines intracellulaires en réponse à la stimulation à la PMA/ionomycine. D'après Burke Schinkel et al. (2024).

A notre connaissance, aucune étude n'a encore exploré les effets des MOs sur les LPMCs. Les recherches existantes se concentrent exclusivement sur les PBMCs. En général, ces études ciblent des types cellulaires spécifiques isolés des PBMCs à l'aide de marqueurs de surface et de techniques de séparation telles que les billes magnétiques ou le tri cellulaire. Parmi les cellules particulièrement étudiées, on trouve :

- Les cellules dendritiques, en première ligne pour capter les MOs présents dans la lumière intestinale, elles jouent un rôle de sentinelles (Coombes and Powrie, 2008). Cependant, les PBMCs ne contiennent que 1 à 2% de cellules dendritiques contre 10 à 20% de monocytes (Plantinga et al., 2015). Pour pallier cette limite, il est courant de différencier les monocytes en cellules dendritiques avec des facteurs de stimulation et cytokines (Boll et al., 2024).
- Les lymphocytes T : ils peuvent également être isolés des PBMCs et étudiés de manière ciblée (Lozano-Ojalvo et al., 2015).

Les protocoles couramment utilisés consistent à activer les cellules dendritiques avec les MOs, puis à les cultiver avec des lymphocytes T afin de reproduire les interactions physiologiques observées *in vivo* (Eiwegger et al., 2010; Xiao et al., 2019; Ayechu-Muruzabal et al., 2022; Zuurveld et al., 2023).

### 3. Intérêt de la stimulation des cellules immunitaires en culture

Lorsque les cellules sont en culture leur production de cytokines est faible et leur prolifération est limitée. Pour détecter une réponse immunitaire significative, il est nécessaire d'induire à la fois la prolifération et l'activation de ces cellules. L'une des méthodes les plus couramment utilisées est l'utilisation de mitogènes polyclonaux, qui stimulent efficacement la prolifération des cellules immunitaires. Les stimulants couramment utilisés incluent :

- Les lectines végétales, telles que la phytohémagglutinine (PHA), la Concanavaleine A (ConA) ou la Pokeweed mitogen (PWM), qui se lient aux glucides présents sur les récepteurs des cellules immunitaires et déclenchent une cascade de signaux intracellulaires menant à la mitose et à une réponse inflammatoire (Murphy and Weaver, 2016).
- Le LPS, composant de la paroi des bactéries Gram -, qui active principalement les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B, induisant la production de médiateurs pro-inflammatoires (Khatua et al., 2021).
- La combinaison phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), extrait de végétaux, et de ionomycine, connue pour stimuler les lymphocytes T et favoriser la production de cytokines (Ai et al., 2013).

Le LPS est fréquemment utilisé comme contrôle positif dans les essais de stimulation immunitaire en raison de sa capacité à déclencher une production accrue de médiateurs pro-inflammatoires. L'objectif est de détecter si les MOs ont la capacité de réduire l'inflammation

induite par le LPS (Sotgiu et al., 2006; Xiao et al., 2019; Boll et al., 2024). Il est également possible de cultiver les cellules avec les MOs pendant quelques heures avant d'induire l'inflammation au LPS, ce genre d'expérimentation vise à observer si les MOs permettent de préparer le système immunitaire à des stress futurs (Tang et al., 2025). Dans les deux cas, les facteurs pro-inflammatoires sont mesurés et comparés entre les cellules stimulées en présence des MOs et les cellules uniquement stimulées, afin d'identifier un éventuel effet anti-inflammatoire des MOs. De plus, la PMA a été utilisée pour différencier les lignées cellulaires THP-1 en macrophages (Walsh et al., 2024) afin d'intensifier leur réponse à des stimuli pro-inflammatoires comme le LPS (Kämpfer et al., 2017). Cependant, il a été montré que même en l'absence de stimulation par le LPS, la PMA augmente significativement la production de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  dans les cellules THP-1 et représente donc également un modèle efficace de stimulation des lymphocytes T et d'inflammation pour l'étude des MOs (Grigalevičiūtė et al., 2023). Par ailleurs, le LPS et la PMA/ionomycine induisent une réponse immunitaire dans les PBMCs isolées chez le porc (Gao et al., 2010) et chez le lapin (Jacquier et al., 2015). Ils apparaissent donc comme de bons candidats pour approfondir la compréhension de l'effet immunomodulateur des MOs et évaluer leur potentiel à réguler la réponse immunitaire et l'inflammation *in vitro*.

### C. Etude d'un mélange d'oligosaccharides du lait ou d'oligosaccharides du lait individuels

#### 1. Le choix des oligosaccharides du lait étudiés

Le choix des oligosaccharides du lait utilisés dans les études est déterminant, car leurs effets peuvent varier en fonction de leur origine, de leur méthode de synthèse et de leur purification. Comme nous l'avons vu précédemment (II.A), indépendamment des méthodes de synthèse des MOs, la purification constitue une étape cruciale : une contamination peut biaiser les résultats expérimentaux. Perdijk et al. (2018) ont démontré que, dans un de leurs essais, les effets du 3'-SL étaient dus à une contamination en LPS dans le produit commercial. De même, Zuurveld et al. (2023) ont observé que la méthode de synthèse influence l'immunomodulation des MOs, indépendamment des niveaux d'endotoxines qui restaient très faibles dans l'ensemble des échantillons de MOs. Ainsi, dans un même modèle expérimental, des MOs obtenus par voie enzymatique et bactérienne induisent des profils de production de cytokines différents ainsi que des phénotypes variés des lymphocytes T.

La majorité des études utilisent des mélanges de MOs afin de mimer la complexité présente dans le lait maternel et d'explorer les effets de synergie potentielle. Les modèles les plus physiologiques étant ceux utilisant du lait isolé directement de donneuses volontaires (Eiwegger et al., 2004; Ward et al., 2007; Marcobal et al., 2010; Zhang et al., 2019a). Toutefois, certaines études se concentrent sur des MOs individuels (Comstock et al., 2014; Ayechu-Muruzabal et al., 2022; Kijner et al., 2022a; Zuurveld et al., 2023), permettant ainsi d'identifier les spécificités fonctionnelles selon la structure de chaque MO.

## 2. La dose des oligosaccharides du lait

Les études *in vitro* explorant les effets des MOs sur le microbiote utilisent généralement des concentrations variant de 5 mg.mL<sup>-1</sup> à 20 mg.mL<sup>-1</sup>, reflétant les teneurs observées dans le lait maternel humain (Ward et al., 2006; Marcobal et al., 2010; Kijner et al., 2022a; Renwick et al., 2025). Cependant, certaines études ajustent les doses selon le type de MO étudié pour mimer plus fidèlement les concentrations physiologiques. Par exemple, Yu et al. (2013) ont testé le 2'-FL et le 3-FL à 2 mg.mL<sup>-1</sup>, mais seulement 1 mg.mL<sup>-1</sup> pour le lactodifucotetraose (LDFT) et 6'-SL et 0.5 mg.mL<sup>-1</sup> de 3'-SL, en accord avec leurs proportions respectives dans le lait maternel. A l'inverse, certaines études appliquent une concentration uniforme pour tous les MOs testés (Cheng et al., 2020b; Salli et al., 2021).

Concernant les études *in vitro* sur les effets des MOs sur la réponse immunitaire, les doses de MOs utilisées varient généralement de 1 à 10 mg.mL<sup>-1</sup>. En effet, déterminer la part exacte de MOs qui interagit avec le système immunitaire est complexe, une quantité majeure des MOs étant fermentée par le microbiote. De plus, bien que les MOs interagissent principalement avec les cellules immunitaires du GALT, une faible fraction, de 1 à 5%, peut passer dans le sang, l'urine et les fèces des nouveau-nés (Goehring et al., 2014). Certaines études justifient l'emploi de doses élevées par rapport aux doses physiologiques afin d'amplifier les effets et faciliter leur détection. Par exemple, Ayechu-Muruzabal et al. (2022) ont utilisé 5 mg.mL<sup>-1</sup> de 2'-FL sur des monocytes et lymphocytes T dérivés de PBMCs, arguant que ces concentrations permettraient de mieux comprendre les mécanismes d'action potentiels. A l'inverse, des doses plus proches des niveaux physiologiques sont parfois appliquées (Xiao et al., 2019; Zhang et al., 2019a; Zuurveld et al., 2023), avec des distinctions possibles selon les MOs. Ainsi, Eiwegger et al. (2004) ont utilisé 10 µg.mL<sup>-1</sup> pour les MOs neutres et 1 µg.mL<sup>-1</sup> pour les MOs acides, ces derniers étant moins abondants dans le lait humain. De même, une concentration de 30 µg.mL<sup>-1</sup> de 2'-FL a été considérée comme se rapprochant des concentrations systémiques physiologiques de ce MOs (Sotgiu et al., 2006).

Le sevrage est une période de changements importants chez les mammifères. Celui-ci a lieu tôt dans les élevages, alors même que les structures intestinales sont encore en développement. Ceci peut être à l'origine de troubles digestifs, traités par l'utilisation d'antibiotiques. L'antibiorésistance nécessite la réduction de ces traitements, particulièrement en élevage porcin et cunicole, les élevages les plus utilisateurs d'antibiotiques. La fenêtre d'opportunité indique la période au cours de laquelle le microbiote est dynamique et peut être modulé de façon à orienter un développement bénéfique des barrières intestinales. Cette notion a rendu particulièrement intéressant l'utilisation de stratégies nutritionnelles en amont du sevrage. Les oligosaccharides du lait représentent donc une opportunité au regard de leurs nombreux bénéfices, et leurs effets chez nos espèces d'intérêts méritent d'être explorés.



# Problématique et objectifs de recherche



Le sevrage est une période critique pour les porcelets et lapereaux, marquée par le passage d'une alimentation lactée très digestible à un régime solide plus complexe, associée à une séparation d'avec la mère et un changement d'environnement. Ce bouleversement survient alors que la barrière intestinale est encore immature, limitant les capacités de défense de l'hôte. En élevage, le sevrage est souvent précoce, accentuant les effets de cette immaturité intestinale et entraînant fréquemment des troubles digestifs. Ces troubles sont à l'origine d'une utilisation importante d'antibiotiques, dont la réduction est un enjeu majeur pour limiter l'émergence de résistances antimicrobiennes préoccupantes pour la santé publique. Ainsi, favoriser un développement optimal de la barrière intestinale permettrait aux jeunes mammifères de mieux appréhender la période du sevrage et ses bouleversements. Les approches nutritionnelles constituent un levier prometteur pour renforcer la barrière intestinale, particulièrement au début de la vie, où la plasticité intestinale permet la modulation de la barrière intestinale. Parmi elles, les oligosaccharides du lait, premiers prébiotiques disponibles pour le nouveau-né, se distinguent par leurs effets bénéfiques démontrés sur le microbiote intestinal et la réponse immunitaire. Plusieurs études ont montré que ces effets varient selon la structure spécifique des oligosaccharides du lait. Dans ce contexte, la comparaison entre mammifères, qui présentent des profils en oligosaccharides du lait différents, permettrait d'enrichir notre compréhension des liens entre structure et fonction, en relation avec les besoins spécifiques des nouveau-nés propre à chaque espèce et notamment en termes de développement de la barrière intestinale.

Dans ce cadre, notre objectif de recherche était de **comprendre les liens fonctionnels entre la diversité de structure des MOs, les capacités métaboliques des bactéries commensales du microbiote et la réponse immunitaire intestinale** afin de favoriser la maturation de la barrière intestinale au sevrage et de limiter l'incidence des troubles digestifs ainsi que l'usage des antibiotiques en élevage.

Nous avons posé l'hypothèse que les oligosaccharides du lait permettraient la modulation du microbiote et du système immunitaire des porcelets et lapereaux, mais que ces fonctions variaient selon la structure des oligosaccharides du lait. La finalité de ce travail de thèse est de mieux comprendre le rôle des oligosaccharides du lait sur la santé et de proposer des stratégies nutritionnelles visant à réduire l'incidence des troubles digestifs et l'usage des antibiotiques en élevages porcins et cunicoles.

Afin de répondre à ces objectifs, nous avons suivi une démarche expérimentale en deux étapes (Figure 27). Dans un premier temps, dans le cadre d'une stratégie *in silico* (Figure 27), nous avons contribué à un projet de construction d'une base de données pour rechercher, visualiser et analyser les profils de MOs au regard des différentes sources de variation à partir des données de la littérature par text mining. Dans ce cadre, deux outils ont été produits. Pour pallier l'absence d'une nomenclature homogène pour les MOs, le premier outil est un thésaurus de synonymes permettant de nommer les différents MOs à partir des données de

la littérature scientifique (Etape 1, résultats décrits dans l'article 1). Le second outil correspond à la réalisation d'une annotation manuelle des caractéristiques des MOs et des femelles au sein d'un corpus de textes scientifiques dans le but d'amorcer le travail de text mining (Etape 1, résultats décrits dans l'article 2).

Dans un second temps, nous avons étudié la fonctionnalité des oligosaccharides du lait *in vitro* (Figure 27). La première étude a consisté à analyser la capacité des bactéries commensales intestinales de porcelets et lapereaux à dégrader les oligosaccharides du lait selon la structure de ces derniers (Etape 2.1, résultats décrits dans l'article 3). Ensuite, nous avons analysé la réponse immunitaire intestinale aux oligosaccharides du lait (mise au point méthodologique décrite dans l'article 4). Pour ce faire nous avons distingué les effets des oligosaccharides du lait (i) directs et (ii) indirects par le biais des métabolites issus de la dégradation des MOs par les bactéries commensales intestinales (Etape 2.2, résultats décrits dans l'article 5).

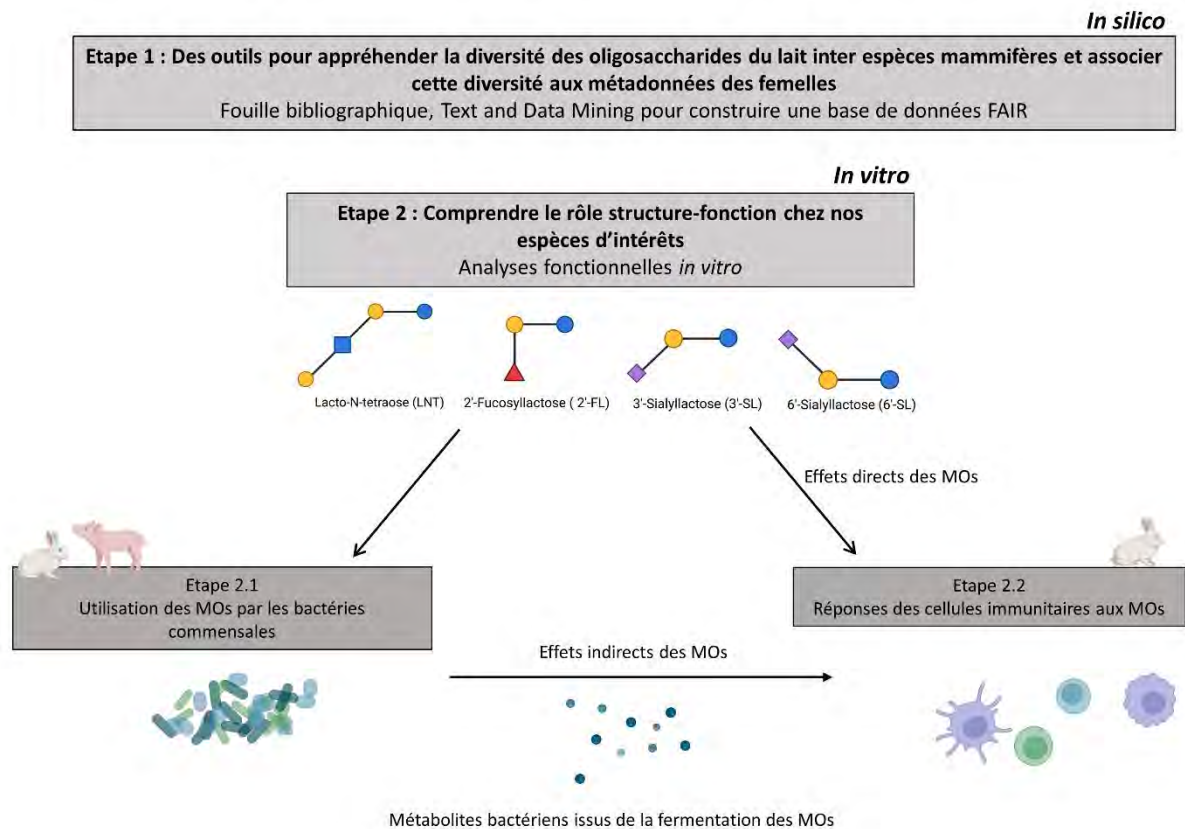


Figure 27 : Stratégie expérimentale pour répondre à l'objectif de thèse. MOs : oligosaccharides du lait

# Etudes expérimentales



## Chapitre 1 Des outils pour évaluer la diversité des oligosaccharides du lait en lien avec les métadonnées de la femelle

---

La diversité des profils en MOs a été largement documentée, et plusieurs facteurs tels que l'espèce, le stade de lactation, la génétique ou encore la géographie ont été identifiés comme déterminants dans ces variations. Cependant, les données disponibles restent dispersées dans la littérature scientifique, et aucune base de données ne centralise les connaissances accumulées ces dernières années. L'ampleur de l'information publiée souligne la nécessité d'un traitement automatique de ces données, permettant leur extraction, leur organisation et leur exploitation à grande échelle.

Mon travail s'inscrit dans cette dynamique, avec pour objectif final le développement d'un outil automatisé capable d'extraire et d'organiser les données relatives à la composition en MOs à partir de la littérature scientifique. Dans cette perspective, le développement d'un outil automatisé repose d'abord sur la constitution d'un corpus annoté manuellement. Il s'agit d'une collection de textes représentatifs, annotés manuellement et lisibles par une machine (Pustejovsky and Stubbs, 2013), destinée à entraîner les algorithmes d'extraction d'informations. Au début de ce travail, aucun corpus annoté dédié aux MOs n'était disponible, nous avons donc élaboré un tel corpus. Cependant, une difficulté est rapidement apparue : l'absence d'une nomenclature homogène pour les MOs compliquait la reconnaissance automatique des entités. Il est alors devenu nécessaire de construire une ressource sémantique spécifique.

Nous avons donc mis en place un thésaurus dédié aux MOs, recensant 245 MOs, décrits selon 22 caractéristiques. Ce travail, qui constitue la base du premier article présenté dans ce chapitre, a permis de garantir une annotation sémantique cohérente dans la suite du projet, en facilitant la reconnaissance d'entités nommées, étape qui nécessite d'associer chaque entité à un identifiant issu d'une ressource sémantique, tâche connue sous le nom d'Entity Linking (Pustejovsky and Stubbs, 2013). Ce premier article s'accompagne d'un dépôt sur l'entrepôt recherche.data.gouv (RDG), disponible au lien suivant <https://doi.org/10.57745/RA5DAC> ainsi que sur l'outil de gestion de données AgroPortal. Une fois ce socle sémantique établi, nous avons construit un corpus annoté de 30 textes issus de 20 articles scientifiques. Pour structurer cette annotation, nous avons défini un schéma d'annotation spécifiant les quatorze entités à extraire (notamment les MOs, les espèces, les métadonnées) ainsi que les relations à établir entre elles. Le schéma d'annotation est complété par des guidelines détaillées, définissant précisément les règles d'application et d'interprétation du schéma sur les textes à annoter (Pustejovsky and Stubbs, 2013). Dans une logique de science ouverte et reproductible (démarche FAIR), ces guidelines sont mises à disposition pour une utilisation dans d'autres projets d'annotation. Ce travail, incluant le schéma d'annotation, les guidelines et le corpus est présenté dans le second article de ce

chapitre. Il s'accompagne également d'un dépôt sur l'entrepôt recherche.data.gouv (RDG) au lien suivant <https://doi.org/10.57745/LFXGFO>. Les guidelines sont quant à elles disponibles, sous la forme d'un rapport de 50 pages, sur l'archive ouverte HAL sous le doi [10.17180/94mt-v661](https://doi.org/10.17180/94mt-v661).

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'unité MaIAGE (INRAe, Jouy-en-Josas), experts en extraction d'informations et développement de bases de données, mais non spécialistes des MOs. Mon rôle a donc été d'apporter l'expertise biologique nécessaire à la construction du thésaurus, à la conception du schéma d'annotation, à la rédaction des guidelines, et à l'annotation manuelle d'un ensemble de textes scientifiques.

**Article 1 : MilkOligoThesaurus, un ensemble de synonymes d'oligosaccharide du lait de mammifères**

**Revue Data In Brief**, 2024, Volume 54, 110404.

<https://doi.org/10.1016/j.dib.2024.110404>

Rumeau M., Fenaille F., Girard A., Loux V., Ba M., Nédellec C., Deléger L., Bossy R., Aubin S., Knudsen C. et Combes S.

Mots clés : Nomenclature chimique ; nom normalisé des oligosaccharides du lait ; masse isotopique des oligosaccharides du lait ; composition en monosaccharide des oligosaccharides du lait ; isomère des oligosaccharides du lait ; extraction du vocabulaire ; noms systématiques

Résumé : Les oligosaccharides du lait suscitent un intérêt croissant en raison des nombreux bienfaits qu'ils présentent pour la santé des nouveau-nés et à long terme. De nombreuses structures d'oligosaccharides du lait ont été identifiées dans le lait des mammifères. La richesse en oligosaccharides du lait a principalement été décrite dans le lait humain, mais elle a également été rapportée pour une large gamme d'espèces de mammifères. La structure des oligosaccharides du lait est particulièrement difficile à décrire, car elle résulte de la combinaison de cinq monosaccharides liés par diverses liaisons glycosidiques, formant ainsi des matrices structurellement diverses et complexes d'oligosaccharides linéaires et ramifiés. L'exploration de la littérature et l'extraction d'informations pertinentes sur la diversité des oligosaccharides du lait d'une espèce à l'autre ou au sein d'une même espèce semblent prometteuses pour élucider le rôle structure-fonction des oligosaccharides du lait. Actuellement, compte tenu de la complexité de ces molécules, les principaux problèmes liés à l'exploration de la littérature pour extraire des informations pertinentes sur la diversité des oligosaccharides du lait d'une espèce à l'autre ou au sein d'une même espèce sont liés à l'hétérogénéité de la manière dont les auteurs se réfèrent à ces molécules. Nous présentons ici un thésaurus (MilkOligoThesaurus) comprenant les noms et synonymes des oligosaccharides du lait recueillis dans des articles clés sélectionnés à partir d'analyses du lait de mammifères. MilkOligoThesaurus rassemble les noms des oligosaccharides du lait avec une description complète de leur composition en monosaccharides et de leur structure. Lorsqu'il est disponible, chaque molécule d'oligosaccharides du lait est associée à son identifiant dans les bases de données PubChem et ChEBI du NCBI. MilkOligoThesaurus est fourni sous forme de tableau. Il rassemble 245 structures d'oligosaccharides du lait uniques décrites par 22 caractéristiques (colonnes), dont le nom de la molécule, son abréviation, les identifiants des bases de données chimiques si disponibles, la composition en monosaccharides, les informations chimiques (formule moléculaire, masse monoisotopique), les synonymes, sa formule sous forme condensée et sous forme condensée abrégée, le nom systématique abrégé, le nom systématique, le groupe d'isomères et les sources des articles scientifiques. MilkOligoThesaurus est également fourni dans le format SKOS (Simple Knowledge

Organization System). Ce thésaurus est une ressource précieuse qui rassemble les variations de dénomination des oligosaccharides du lait qui ne sont pas trouvées ailleurs, pour (i) l'exploration de textes et de données afin de permettre l'annotation automatique et l'extraction rapide de données sur les oligosaccharides du lait à partir d'article scientifiques ; (ii) les chercheurs en biologie qui souhaitent rechercher ou déchiffrer la structure des oligosaccharides du lait sur la base de n'importe lequel de leurs noms, abréviations ou compositions en monosaccharides et liaisons.



## Data Article

## MilkOligoThesaurus, a dataset of mammalian milk oligosaccharide synonyms



Mathilde Rumeau<sup>a</sup>, François Fenaille<sup>b</sup>, Agnès Girard<sup>c</sup>,  
Valentin Loux<sup>d,e</sup>, Mouhamadou Ba<sup>d,e</sup>, Claire Nédellec<sup>e</sup>,  
Louise Deléger<sup>e</sup>, Robert Bossy<sup>e</sup>, Sophie Aubin<sup>f</sup>, Christelle Knudsen<sup>a</sup>,  
Sylvie Combes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, 31326, Castanet-Tolosan, France

<sup>b</sup> Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), MetaboHUB, 91191 Gif sur Yvette

<sup>c</sup> INRAE, LPGP, 35000 Rennes, France

<sup>d</sup> Université Paris-Saclay, INRAE, BioinfOmics, MIGALE Bioinformatics Facility, Jouy-en-Josas, France

<sup>e</sup> Université Paris-Saclay, INRAE, MalAGE, Jouy-en-Josas, France

<sup>f</sup> INRAE, DipSO, 42 rue Georges Morel, 49070 Beaucazoué, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 3 October 2023

Revised 22 February 2024

Accepted 5 April 2024

Available online 9 April 2024

Dataset link: [MilkOligoThesaurus: A milk oligosaccharide thesaurus \(HoloOLIGO project\) \(Original data\)](#)

## Keywords:

Chemical nomenclature

Normalized milk oligosaccharide name

Milk oligosaccharide monoisotopic mass

Milk oligosaccharide monosaccharide

composition

Oligosaccharide isomer name

Vocabulary extraction

Systematic names

## ABSTRACT

There is a growing interest in milk oligosaccharides (MOs) because of their numerous benefits for newborns' and long-term health. A large number of MO structures have been identified in mammalian milk. Mostly described in human milk, the oligosaccharide richness, although less broad, has also been reported for a wide range of mammalian species. The structure of MOs is particularly difficult to report as it results from the combination of 5 monosaccharides linked by various glycosidic bonds forming structurally diverse and complex matrices of linear and branched oligosaccharides. Exploring the literature and extracting relevant information on MO diversity within or across species appears promising to elucidate structure–function role of MOs. Currently, given the complexity of these molecules, the main issues in exploring literature to extract relevant information on MO diversity within or across species relate to the heterogeneity in the way authors refer to these molecules. Herein, we pro-

\* Corresponding author.

E-mail address: [sylvie.combes@inrae.fr](mailto:sylvie.combes@inrae.fr) (S. Combes).

Social media: [@vloux](#) (V. Loux)

vide a thesaurus (MilkOligoThesaurus) including the names and synonyms of MOs collected from key selected articles on mammalian milk analyses. MilkOligoThesaurus gathers the names of the MOs with a complete description of their monosaccharide composition and structures. When available, each unique MO molecule is linked to its ID from the NCBI PubChem and ChEBI databases. MilkOligoThesaurus is provided in a tabular format. It gathers 245 unique oligosaccharide structures described by 22 features (columns) including the name of the molecule, its abbreviation, the chemical database IDs if available, the monosaccharide composition, chemical information (molecular formula, monoisotopic mass), synonyms, its formula in condensed form, and in abbreviated condensed form, the abbreviated systematic name, the systematic name, the isomer group, and scientific article sources. MilkOligoThesaurus is also provided in the SKOS (Simple Knowledge Organization System) format. This thesaurus is a valuable resource gathering MO naming variations that are not found elsewhere for (i) Text and Data Mining to enable automatic annotation and rapid extraction of milk oligosaccharide data from scientific papers; (ii) biology researchers aiming to search for or decipher the structure of milk oligosaccharides based on any of their names, abbreviations or monosaccharide compositions and linkages.

© 2024 The Author(s). Published by Elsevier Inc.

This is an open access article under the CC BY-NC license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

## Specifications Table

Subject	Biochemistry
Specific subject area	Mammalian milk analysis, milk oligosaccharide names, milk oligosaccharide monosaccharide composition, milk oligosaccharide isomer, milk oligosaccharide structure, biochemistry
Data format	Raw, Analyzed
Type of data	Table, Figure
Data collection	A total of 245 milk oligosaccharide names were collected from 11 selected scientific papers. To avoid confusion or misspellings in the naming of the MOs, selected papers had to meet the following inclusion criteria: to report an extensive list of milk oligosaccharides AND to report their monosaccharide composition AND to detail their isomeric structures using the Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans or Oxford symbol nomenclature. Descriptive information such as chemical formula and monoisotopic mass was obtained from chemical databases (ChEBI and PubChem) and linked with unique identifiers.
Data source location	GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, 31326 Castanet-Tolosan, France
Data accessibility	Repository name: <a href="https://entrepot.recherche.data.gouv.fr/dataverse/inrae">https://entrepot.recherche.data.gouv.fr/dataverse/inrae</a> Data identification number (DOI) <a href="https://doi.org/10.57745/RA5DAC">https://doi.org/10.57745/RA5DAC</a> Direct URL to data: <a href="https://doi.org/10.57745/RA5DAC">https://doi.org/10.57745/RA5DAC</a>

## 1. Value of the Data

- The first purpose of the thesaurus is to be used to automatically detect and normalize MO mentions across the literature. In order to gain knowledge on the role of MOs it is necessary to find, visualize and analyze MO patterns that are scattered in thousands of scientific papers.

MilkOligoThesaurus covers a wide range of MO names and synonyms, and associates them to a restricted and standardized terminology. Text-mining methods can use the standardization proposed by MilkOligoThesaurus to normalize the variability of MO mentions in natural language texts, thus facilitating data exchange and integration. The thesaurus is designed to be human and computer-readable, making it easy to share and use.

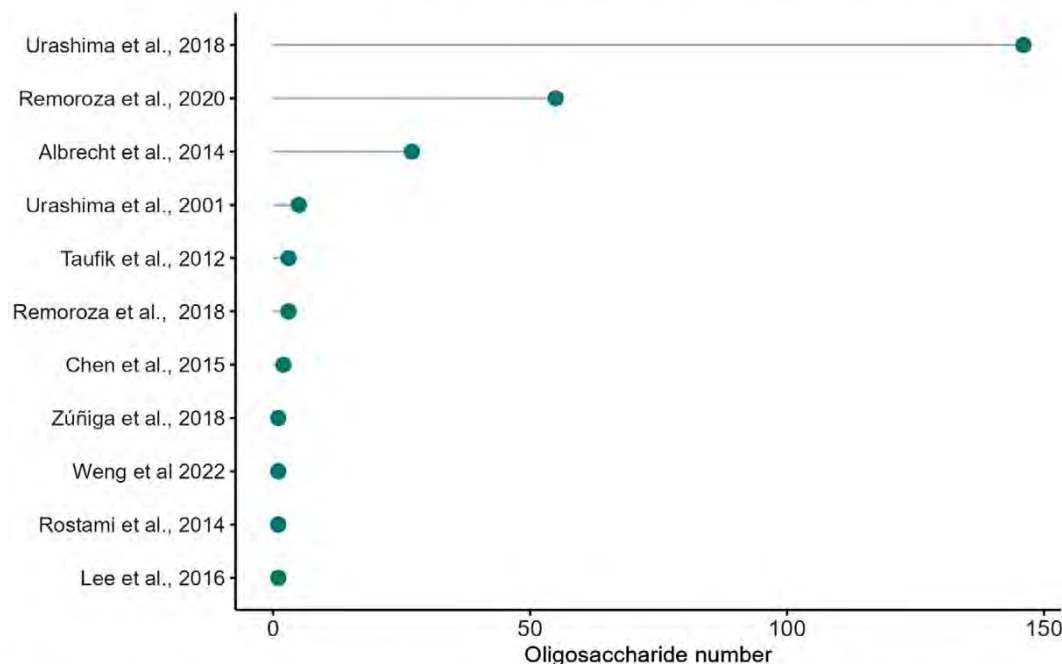
- Text mining is an automatic process that consists of automatic steps: 1) collecting relevant documents, 2) recognizing in the documents' content the named entities of MO type and all other relevant types (e.g. species, lactation stages), 3) normalizing the named entities by the reference, i.e. linking the MO mentions to the entries of the MilkOligoThesaurus. On one hand, the MilkOligoThesaurus is the reference for MO normalization, on the other hand it serves as a lexical resource to support named entity recognition and normalization. Several strategies were developed and investigated to exploit external lexical and semantic resources to improve machine learning models. These strategies include thematic masking [1], named entity recognition by distant supervision [2], and ontology-based normalization [3].
- The biological roles of MOs depend mainly on their structure. Numerous studies have been carried out to elucidate these structure–function relationships. However, the heterogeneity in the way authors have named and reported these molecules is the main pitfall for academic and industrial researchers in having a clear overview of the published results. MilkOligoThesaurus is a valuable resource that will help the scientific community to navigate and explore the various structural variations of MOs and easily identify unique biologically significant MOs referred to with variable names or identifiers.
- The thesaurus will enable academic and industrial researchers to identify the usual way of naming MOs and provide them with a direct link to their monosaccharide composition and isomeric structure, including glycosidic linkages.
- The format of MilkOligoThesaurus allows it to be regularly updated with the latest discoveries on milk oligosaccharides. In this way, the current version will continue to evolve alongside with the availability of new data.

## 2. Background

Depending on the author's scientific background, the names given to milk oligosaccharides (MOs) in scientific publications are very heterogeneous and no consensus has yet been reached. Some MOs have no or several designations. Thus, collecting MO characteristics is a time-consuming process. To date, only two databases are dedicated to oligosaccharides found in mammalian milk, the National Institute of Standards and Technology (NIST) mass spectral library of free oligosaccharides in milk of mammals [4] as well as the recently published MilkOligoDB [5]. The aim of these databases is to explore the MO structural diversity across mammals by direct analysis of mammalian milk samples for the NIST database or through the harvest of MOs from the literature for MilkOligoDB. Both are exhaustive MO databases but none of them provide neither normalized names nor synonyms for most of the molecules registered. Some MO names and their chemical description can be found in larger chemical databases such as ChEBI, PubChem or GlyGen. Still none of these databases provides (i) all the naming variations (ii) and classify the molecule as a constituent of milk. On the basis of these observations, we built MilkOligoThesaurus that gathers the naming variations found in the literature.

## 3. Data Description

The names given to milk oligosaccharides (MOs) in scientific publications are very heterogeneous, probably due to their structural diversity and complexity, and the broad scientific area they are related to. MilkOligoThesaurus lists the most commonly identified MOs by analyzing selected reference scientific articles. Accordingly, MilkOligoThesaurus aims to:



**Fig. 1.** Number of milk oligosaccharides extracted from the eleven sources used to build MilkOligoThesaurus.

- Associate each MO with its chemical properties (monoisotopic mass, formula, monosaccharide composition, and linkages)
- Propose a consensus name for MOs with heterogenous names found in the eleven selected articles and in the two chemical databases, or the MOs without names
- Index MO synonyms
- Build a FAIR (Findable, Accessible, Interoperable, Reusable) tool bound to evolve alongside with milk oligosaccharide knowledge [6].

MilkOligoThesaurus is accessible in the public data repository <https://entrepot.recherche.data.gouv.fr/dataverse/inrae> and registered with the following DOI: <https://doi.org/10.57745/RA5DAC>. Table 1 lists the sources used to extract the vocabulary (name and abbreviation) of the MOs. These sources were obtained from PubMed and Web of Science (WOS) databases. Four articles are reviews that summarize the structures of several milk oligosaccharides from different species including Human. The remaining articles are descriptive studies that analyze the MO composition of several individuals from different species. Each article provides an extensive list of milk oligosaccharides.

Fig. 1 presents the number of MO names extracted from the eleven sources used to build the thesaurus. Considering the redundancy of the information in the literature, a total of 11 articles was used to harvest the most common milk oligosaccharides. As shown in Fig. 1, the majority (95 %) of molecules have been extracted from three articles, illustrating the redundancy in the molecule names found in the set of papers. Fig. 2 presents the distribution of the number of names or abbreviations per oligosaccharide retrieved from the eleven sources, and from the databases ChEBI, PubMed and MilkOligoDB [5]. Of the 245 MOs, most had more than one unique name and more than one unique abbreviated name (127 MOs had three or more names or abbreviations Fig. 2). Nine had no name, one MO had only one denomination (B-tetrasaccharide with its IUPAC abbreviated form  $\text{Gal}(\alpha 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)[\text{Fuc}(\alpha 1-2)]\text{Glc}$ ).

The 245 oligosaccharides identified in mammalian milk retrieved from these sources were compiled in a 22-column tabular file. This tabular file is stored in the public data repository <https://entrepot.recherche.data.gouv.fr/dataverse/inrae> and registered with the following DOI: <https://doi.org/10.57745/RA5DAC>. Table 2 describes the content of each column of the tabular file.

In order to share this work and make it machine-actionable, the data were converted into the Simple Knowledge Organization System (SKOS) format and made available on the AgroPortal ontology repository <https://agroportal.lirmm.fr/ontologies/MILKOLIGO/>. We selected the features

**Table 1**

List of the eleven sources used to build MilkOligoThesaurus. These sources have been obtained from PubMed or Web of Science (WOS) databases. MO = milk oligosaccharide.

First author, year	DOI	Title ( <i>targeted species</i> )	Type of study
Urashima et al., 2018	<a href="https://doi.org/10.4052/tigg.1734.1SE">10.4052/tigg.1734.1SE</a>	Human milk oligosaccharides as essential tools for basic and application studies on galectins ( <i>Human</i> )	Review article
Remoroza et al., 2020	<a href="https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00342">10.1021/acs.analchem.0c00342</a>	Increasing the coverage of a mass spectral library of milk oligosaccharides using a hybrid-search-based bootstrapping method and milks from a wide variety of mammals ( <i>cow, goat, asian buffalo, african lion</i> )	Research article
Albrecht et al., 2014	<a href="https://doi.org/10.1017/S0007114513003772">10.1017/S0007114513003772</a>	A comparative study of free oligosaccharides in the milk of domestic animals ( <i>cow, goat, sheep, pig, horse, dromedary camel</i> )	Research article
Urashima et al., 2001	<a href="https://doi.org/10.1023/a:1014881913541">10.1023/a:1014881913541</a>	Oligosaccharides of milk and colostrum in non-human mammals ( <i>brown capuchin, cow, buffalo, horse, goat, sheep, Ezo brown bear, Japanese black bear, Polar bear, white nosed coati, crabeater seal, hooded seal, elephant, rat, dog</i> )	Review article
Taufik et al., 2012	<a href="https://doi.org/10.1007/s10719-012-9370-9">10.1007/s10719-012-9370-9</a>	Structural characterization of neutral and acidic oligosaccharides in the milks of strepsirrhine primates: greater galago, aye-aye, Coquerel's sifaka and mongoose lemur ( <i>greater galago, aye-aye, Coquerel's sifaka, mongoose lemur</i> )	Research article
Remoroza et al., 2018	<a href="https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01176">10.1021/acs.analchem.8b01176</a>	Creating a mass spectral reference library for oligosaccharides in human milk ( <i>Human</i> )	Research article
Chen et al., 2015	<a href="https://doi.org/10.1016/bs.accb.2015.08.002">10.1016/bs.accb.2015.08.002</a>	Chapter Four - Human Milk Oligosaccharides (HMOS): Structure, Function, and Enzyme-Catalyzed Synthesis ( <i>Human</i> )	Review article
Zúñiga, Monedero & Yebra, 2018	<a href="https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01917">10.3389/fmicb.2018.01917</a>	Utilization of host-derived glycans by intestinal <i>Lactobacillus</i> and <i>Bifidobacterium</i> species ( <i>Human</i> )	Review article
Weng et al. 2022	<a href="https://doi.org/10.1038/s41598-022-15140-7">10.1038/s41598-022-15140-7</a>	Unusual free oligosaccharides in human bovine and caprine milk ( <i>Human, cow, goat</i> )	Research article
Rostami et al., 2014	<a href="https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099824">10.1371/journal.pone.0099824</a>	Milk oligosaccharides over time of lactation from different dog breeds ( <i>dog</i> )	Research article
Lee et al., 2016	<a href="https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02039">10.1021/acs.jafc.6b02039</a>	Rapid screening of bovine milk oligosaccharides in a whey permeate product and domestic animal milks by accurate mass database and tandem mass spectral library ( <i>cow, buffalo, sheep</i> )	Research article

listed in Table 3. An intermediary tabular file was built to prepare the transformation into the SKOS standard. This intermediate tabular file and the following SKOS processed file (.rdf and .ttl) are available at <https://entrepot.recherche.data.gouv.fr/dataverse/inrae> and registered with the following DOI: <https://doi.org/10.57745/RA5DAC>.

**Table 2**

Description of the 22 columns of the MO thesaurus. (MO = milk oligosaccharide).

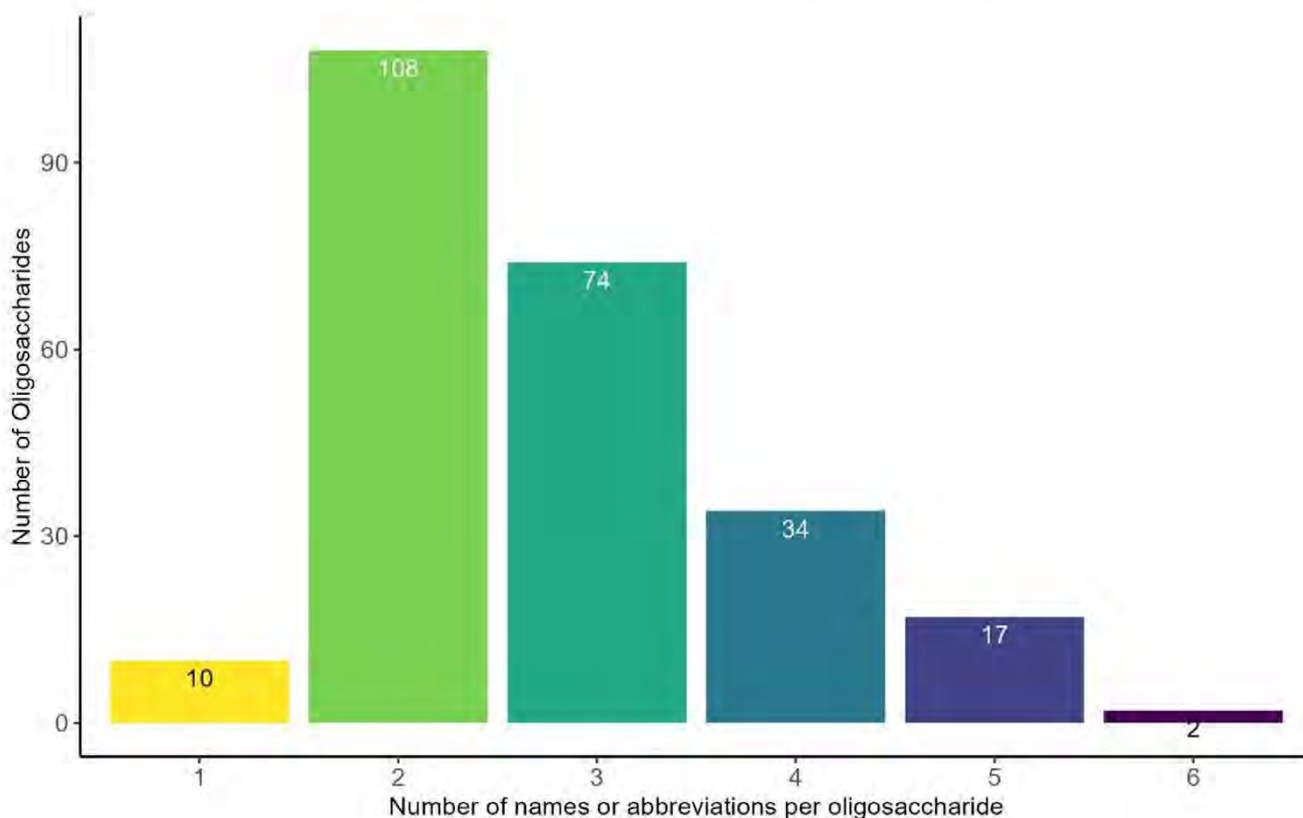
Column	Description
Entry_number	Unique identifier assigned to each MO
URI	Uniform Resource Identifier associates the scheme name <a href="http://opendata.inrae.fr/holooligo/">http://opendata.inrae.fr/holooligo/</a> to the Entry_number
Normalized_MO_name	Consensus full name of the MO
Normalized_MO_name_source	Source from which the full MO name has been extracted
Abbreviated_normalized_MO_name	Consensus abbreviation of the MO name (shorthand MO annotation)
Abbreviated_normalized_MO_name_source	Source from which the abbreviation of the MO has been extracted
InChIKey	MO International chemical identifier, a textual identifier for chemical substances registered in the NCBI PubChem database. Note that not all molecules are registered in this database
CHEBI_ID	MO ID of the chemical ontology ChEBI. Note that not all molecules are registered in this database
Composition_Hex_HexNAc_Fuc_NeuAc_NeuGc	Two common ways to indicate the monosaccharide composition of MO with their respective number
Composition_Hex()HexNAc()dHex()NeuAc()NeuGc()	The chemical formula of the molecule indicates the number of each type of atom of the MO
Formula	MO molecular mass
Monoisotopic_mass	There are several names for the same MO molecule. This column lists synonyms, and includes spelling differences.
Synonyms	MO form according to nomenclature of the MO based on the Symbol Nomenclature for Glycans (SNFG) guidelines [7]. In abbreviated forms, symbols $\alpha$ and $\beta$ have been replaced by a and b respectively
Abbreviated_IUPAC_condensed_form	MO isomers are oligosaccharides with the same monosaccharide composition but differences in a linkage or in the position of a fucose or sialyl acid. Generic terms are used to gather those isomeric forms with the same formula. Some oligosaccharide analytical techniques are unable to distinguish between isomers; thus authors indicate the presence of isomer groups.
IUPAC_condensed_form	
Abbreviated_IUPAC_extended_form	
IUPAC_extended_form	
Isomer_group	
Isomer_group_abbreviation	
Sourcing_MO_DOI	It contains the identifier of the sources from which the MO structure has been extracted
Author_year	First author and year of publication of the sources from which the MO structure has been extracted
PMID	PMID (PubMed Identifier) of the source from which the MO structure has been extracted

Hex: glucose or galactose, HexNAc N-acetylglucosamine or N- acetylgalactosamine, Fuc or dHex: fucose; NeuAc: N-acetylneuraminic acid; NeuGc: N-glycolylneuraminic acid.

**Table 3**

MO information collected in the SKOS properties.

SKOS properties	Tabulate file columns
URI	URI
skos:prefLabel@en	Normalized_MO_name
skos:altLabel@en(separator=";")	Abbreviated_normalized_MO_name
	Synonyms
	Abbreviated_IUPAC_condensed_form
skos:exactMatch	CHEBI_ID
skos:notation	InChIKey
dct:source	Normalized_MO_name_source
	Sourcing_MO_DOI
	Abbreviated_normalized_MO_name_source



**Fig. 2.** Distribution of the number of names or abbreviations per oligosaccharide in MilkOligoThesaurus.

#### 4. Experimental Design, Materials and Methods

The construction of MilkOligoThesaurus involved the following steps:

First, a query was formulated to retrieve articles about milk oligosaccharides from the PubMed and WOS databases. Among the results, articles were selected based on the following inclusion criteria. They had to:

- Deal with milk oligosaccharides (MOs) in mammalian species including Human.
- Provide an extensive list of MOs, with structural details provided to clearly identify the sequence and linkages of the constituting monosaccharides.
- Detail their isomeric structures using Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans [7] or the Oxford symbol nomenclature [8].

Second, the molecules described in the sources had to meet the following definition adapted from Chen et al. [9] for human MOs:

- MOs are built from five monosaccharides including d-glucose (Glc), d-galactose (Gal), N-acetyl-d-glucosamine (GlcNAc), l-fucose (Fuc), and a sialic acid either N-acetylneuraminic acid or N-glycolylneuraminic (NeuAc or NeuGc, respectively).
- MOs are extended from lactose (Gal $\beta$ 1-4Glc) with Glc at the reducing end with an existing mix of  $\alpha$  and  $\beta$  anomers. While Gal and GlcNAc are always presented with  $\beta$ -d-glycosidic linkages, Fuc and NeuAc are always presented with  $\alpha$ -l- and  $\alpha$ - glycosidic linkages, respectively.

Considering the importance of their occurrence in MO scientific literature, we added some MOs with « deviant » structures according to Chen et al. [9]:

- Milk oligosaccharides containing a terminal N-acetylgalactosamine (GalNAc) such as Fucosyl-galactosaminylactose.
- Structures in which the glucose or lactose at the reducing end have been replaced by N-acetyllactosamine such as 3-Fucosyllactosamine and Disialyllactosamine.

- Milk oligosaccharides including a succession of galactose monosaccharides ( $\alpha$ - or  $\beta$ -linked) such as Isoglobotriose and 6'-Galactosyllactose

MilkOligoThesaurus also contains 2 oligosaccharides that are bound to lipids as they were found in their free form in several non-human milks (Asialo-GM1 and Asialo-GM2) [10].

Third, oligosaccharides were manually searched in two databases: NCBI PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) and ChEBI (<https://www.ebi.ac.uk/chebi/>). If the oligosaccharide was found, relevant information was collected and included: monoisotopic mass, chemical formula, database ID and, if available, synonyms. Whenever the oligosaccharide was not registered in a database, these properties were obtained directly from the scientific articles. As a last resort, some properties could be inferred from the structure of the milk oligosaccharides and comparisons with similar milk oligosaccharides for which properties were available.

Fourth, the data obtained were gathered in the thesaurus. An important number of molecules were found in several of the selected articles, but data were not always consistent regarding the following properties: name, and abbreviated name. Thus, a comparison was made between the sources supported by the chemical database information when available. Consequently, three sources are available for each molecule, analogous or not: the source where the oligosaccharide structure was found (Sourcing\_MO\_Doi), the source we have chosen for the oligosaccharide name (Normalized\_MO\_name\_source) as well as the source we have chosen for the oligosaccharide name abbreviation (Abbreviated\_normalized\_MO\_name\_source).

We encountered two situations: (i) MO had several names. We prioritized the name and abbreviation that allowed relative homogeneity within the same structural group (the other names being included in the "Synonyms" column). In some cases, although the molecule had a name, to make the thesaurus easier to read, we have suggested names considering the similarity of the structure in the same structural group. The names from the scientific source were thus added in the "Synonyms" column. (ii) A few molecules had no names. For some of them, we proposed names based on their structure and/or the names of the closest oligosaccharides. All proposed names are identified in the name and abbreviation source columns by the mention "Author\_proposal" to ensure traceability.

The prime symbol (') in the names of the oligosaccharides indicates that the monosaccharide residue is not linked on the reducing end monosaccharide but on the immediately following residue. The double prime symbol (") indicates that the monosaccharide residue is linked to the residue immediately following the first prime residue (for example 2'-Fucosyllactose stands for Fuc(a1-2)Gal(b1-4)Glc; 3-Fucosyllactose stands for Gal(b1-4)[Fuc(a1-3)]Glc and 3''-Neu5Ac-6'-Neu5Ac-galactotriose stands for NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)[NeuAc(a2-6)]Gal(b1-4)Glc) [11].

Finally, the thesaurus has been converted into the SKOS format using the SKOSplay! converter function (<https://skos-play.sparna.fr/play/convert>) following the recommendations of [12]. And the quality was checked using <https://skos-play.sparna.fr/skos-testing-tool/>. Results are made available on AgroPortal [13] (<https://agroportal.lirmm.fr/ontologies/MILKOLIGO/>), an ontology repository for the agronomy domain. The SKOS format is used to standardize the data and allocate an URI (Unique Resource Identifier) to each concept (milk oligosaccharide) of the thesaurus. This makes MilkOligoThesaurus both machine-readable and humans-friendly, fundamental elements of FAIR principles [6].

## Limitations

None.

## Ethics Statement

The MilkOligoThesaurus construction process did not involve experiments on humans or animals, and no social media data was collected.

## Data Availability

[MilkOligoThesaurus: A milk oligosaccharide thesaurus \(HoloOLIGO project\) \(Original data\)](https://entrepot.recherche.data.gouv.fr/) (<https://entrepot.recherche.data.gouv.fr/>).

## CRediT Author Statement

**Mathilde Rumeau:** Conceptualization, Methodology, Writing – original draft; **François Fenaille:** Data curation, Validation, Writing – review & editing; **Agnès Girard:** Methodology, Resources, Writing – review & editing; **Valentin Loux:** Conceptualization, Writing – review & editing; **Mouhamadou Ba:** Conceptualization, Writing – review & editing; **Claire Nédellec:** Conceptualization, Writing – review & editing; **Louise Deléger:** Conceptualization, Writing – review & editing; **Robert Bossy:** Conceptualization, Writing – review & editing; **Sophie Aubin:** Software, Resources, Writing – review & editing; **Christelle Knudsen:** Conceptualization, Writing – review & editing; **Sylvie Combes:** Conceptualization, Data curation, Validation, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

## Acknowledgments

This work was supported by the ANR (HoloOLIGO project, [ANR-21-CE20-0045-01](#)), the INRAE metaprogram (Holoflux). This work used resources developed as part of the ANR FooSIN project ([ANR-19-DATA-0019-01](#)). Funders had no role in the review process.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## References

- [1] M. Borovikova, A. Ferré, R. Bossy, M. Roche, C. Nédellec, Could keyword masking strategy improve language model?, in: E. Métais, F. Meziane, V. Sugumaran, W. Manning, S. Reiff-Marganiec (Eds.) *Natural Language Processing and Information Systems*, Springer Nature Switzerland, Cham, 2023, pp. 271–284, doi:[10.1007/978-3-031-35320-8\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-031-35320-8_19).
- [2] X. Wang, V. Hu, X. Song, S. Garg, J. Xiao, J. Han, ChemNER: fine-grained chemistry named entity recognition with ontology-guided distant supervision, in: *Proceedings of the 2021 Conference on Empirical Methods in Natural Language Processing*, Dominican Republic, Association for Computational Linguistics, Online and Punta Cana, 2021, pp. 5227–5240, doi:[10.18653/v1/2021.emnlp-main.424](https://doi.org/10.18653/v1/2021.emnlp-main.424).
- [3] A. Ferré, L. Deléger, R. Bossy, P. Zweigenbaum, C. Nédellec, C-Norm: a neural approach to few-shot entity normalization, *BMC Bioinform.* 21 (2020) 579, doi:[10.1186/s12859-020-03886-8](https://doi.org/10.1186/s12859-020-03886-8).
- [4] C.A. Remoroza, T.D. Mak, M.L.A. De Leoz, Y.A. Mirokhin, S.E. Stein, Creating a mass spectral reference library for oligosaccharides in human milk, *Anal. Chem.* 90 (2018) 8977–8988, doi:[10.1021/acs.analchem.8b01176](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01176).
- [5] S.D. Durham, Z. Wei, D.G. Lemay, M.C. Lange, D. Barile, Creation of a milk oligosaccharide database, MilkOligoDB, reveals common structural motifs and extensive diversity across mammals, *Sci. Rep.* 13 (2023) 10345, doi:[10.1038/s41598-023-36866-y](https://doi.org/10.1038/s41598-023-36866-y).
- [6] M.D. Wilkinson, M. Dumontier, I.J. Aalbersberg, G. Appleton, M. Axton, A. Baak, N. Blomberg, J.-W. Boiten, L.B. da Silva Santos, P.E. Bourne, J. Bouwman, A.J. Brookes, T. Clark, M. Crosas, I. Dillo, O. Dumon, S. Edmunds, C.T. Evelo, R. Finkers, A. Gonzalez-Beltran, A.J.G. Gray, P. Groth, C. Goble, J.S. Grethe, J. Heringa, P.A.C. 't Hoen, R. Hooft, T. Kuhn, R. Kok, J. Kok, S.J. Lusher, M.E. Martone, A. Mons, A.L. Packer, B. Persson, P. Rocca-Serra, M. Roos, R. van Schaik, S.-A. Sansone, E. Schultes, T. Sengstag, T. Slater, G. Strawn, M.A. Swertz, M. Thompson, J. van der Lei, E. van Mulligen, J. Velterop, A. Waagmeester, P. Wittenburg, K. Wolstencroft, J. Zhao, B. Mons, The FAIR guiding principles for scientific data management and stewardship, *Sci. Data* 3 (2016) 160018, doi:[10.1038/sdata.2016.18](https://doi.org/10.1038/sdata.2016.18).
- [7] A. Varki, R.D. Cummings, M. Aebi, N.H. Packer, P.H. Seeberger, J.D. Esko, P. Stanley, G. Hart, A. Darvill, T. Kinoshita, J.J. Prestegard, R.L. Schnaar, H.H. Freeze, J.D. Marth, C.R. Bertozzi, M.E. Etzler, M. Frank, J.F. Vliegthart, T. Lütteke, S. Perez, E. Bolton, P. Rudd, J. Paulson, M. Kanehisa, P. Toukach, K.F. Aoki-Kinoshita, A. Dell, H. Narimatsu, W. York, N. Taniguchi, S. Kornfeld, Symbol nomenclature for graphical representations of glycans, *Glycobiology* 25 (2015) 1323–1324, doi:[10.1093/glycob/cwv091](https://doi.org/10.1093/glycob/cwv091).

- [8] D.J. Harvey, A.H. Merry, L. Royle, M.P. Campbell, R.A. Dwek, P.M. Rudd, Proposal for a standard system for drawing structural diagrams of N- and O-linked carbohydrates and related compounds, *Proteomics* 9 (2009) 3796–3801, doi:[10.1002/pmic.200900096](https://doi.org/10.1002/pmic.200900096).
- [9] X. Chen, Chapter four - human milk oligosaccharides (HMOS): structure, function, and enzyme-catalyzed synthesis, in: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Elsevier, 2015, pp. 113–190, doi:[10.1016/bs.accb.2015.08.002](https://doi.org/10.1016/bs.accb.2015.08.002).
- [10] C.A. Remoroza, Y. Liang, T.D. Mak, Y. Mirokhin, S.L. Sheetlin, X. Yang, J.V. San Andres, M.L. Power, S.E. Stein, Increasing the coverage of a mass spectral library of milk oligosaccharides using a hybrid-search-based bootstrapping method and milks from a wide variety of mammals, *Anal. Chem.* 92 (2020) 10316–10326, doi:[10.1021/acs.analchem.0c00342](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00342).
- [11] A.D. McNaught, Nomenclature of carbohydrates (IUPAC Recommendations 1996), *Pure Appl. Chem.* 68 (1996) 1919–2008, doi:[10.1351/pac199668101919](https://doi.org/10.1351/pac199668101919).
- [12] S. Aubin, J. Yon, 3 outils pour transformer du tabulé en SKOS, (2022). <https://hal.science/hal-03852086>.
- [13] C. Jonquet, A. Toulet, E. Arnaud, S. Aubin, E. Dzalé Yeumo, V. Emonet, J. Graybeal, M.-A. Laporte, M.A. Musen, V. Pesce, P. Larmande, AgroPortal: a vocabulary and ontology repository for agronomy, *Comput. Electron. Agric.* 144 (2018) 126–143, doi:[10.1016/j.compag.2017.10.012](https://doi.org/10.1016/j.compag.2017.10.012).

## **Article 2 : MilkOligoCorpus : une ressource annotée sémantiquement pour l'extraction de connaissances sur les oligosaccharides du lait de mammifères**

### **Article en révision à PLOSOne**

Rumeau M., Courtin M., Bossy F., Sauvion C., Loux V. Ba M., Knudsen C., Combes S., Nédellec C. et Deléger L.

Résumé : Les oligosaccharides du lait sont des composants bioactifs qui régulent la composition du microbiote néonatal et exercent des fonctions immunomodulatrices. Leurs effets bénéfiques dépendent de leur structure. De nombreuses études ont montré des variations intra- et inter-espèces dans la composition et la concentration de ces composés dans le lait des mammifères, mais les implications biologiques de ces variations restent mal comprises. Les méthodes automatisées de traitement du langage naturel sont des outils prometteurs pour extraire et rassembler des données structurées à partir de textes non structurés, ce qui permettra de mieux comprendre la signification biologique de la variation des oligosaccharides du lait chez les mammifères. Ces méthodes nécessitent un entraînement et une évaluation sur des corpus de textes annotés manuellement. Bien qu'il existe des corpus annotés pour les substances chimiques, aucun n'est spécifiquement conçu pour l'entraînement des modèles de traitement automatique du langage naturel visant à extraire des informations sur les oligosaccharides du lait.

A cette fin, nous proposons MilkOligoCorpus, un nouveau gold standard pour la composition des oligosaccharides du lait chez les mammifères. Le schéma d'annotation de MilkOligoCorpus est un modèle riche en entités et en relations, conçu pour décrire la diversité des oligosaccharides du lait en fonction de la variabilité des facteurs des femelles, et pour aider à mieux comprendre le lien entre la structure des oligosaccharides du lait et leurs fonctions. MilkOligoCorpus se compose de résumés (15) et d'extraits (15) de 20 articles en texte intégral indexés par PubMed et entièrement annotés avec des entités liées aux individus, aux échantillons, aux oligosaccharides du lait et à la quantification des oligosaccharides du lait, reliées par des relations binaires et n-aires. Pour garantir l'interopérabilité des données entre des publications et des bases de données hétérogènes, quatre ressources terminologiques ont été développées pour attribuer des identifiants uniques aux entités, en s'appuyant sur des ontologies externes.

Cet article présente la création du MilkOligoCorpus et de son schéma associé, ainsi que le développement de guidelines d'annotation et de ressources terminologiques. Nous présentons également les résultats expérimentaux obtenus à l'aide de modèles d'extraction d'information de base sur le corpus.

# MilkOligoCorpus: a semantically annotated resource for knowledge extraction on mammalian milk oligosaccharides

Mathilde Rumeau<sup>1</sup>, Marine Courtin<sup>2</sup>, Robert Bossy<sup>2</sup>, Clara Sauvion<sup>2</sup> Valentin Loux<sup>2,3</sup> Mouhamadou Ba<sup>2,3</sup>, Christelle Knudsen<sup>1</sup>, Sylvie Combes<sup>1</sup>, Claire Nédellec<sup>2</sup> and Louise Deléger<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, 31326, Castanet-Tolosan, France

<sup>2</sup> Université Paris-Saclay, INRAE, MaIAGE, Jouy-en-Josas, France

<sup>3</sup> Université Paris-Saclay, INRAE, BioinfOmics, MIGALE Bioinformatics Facility, Jouy-en-Josas, France

\*Corresponding author

Email: [louise.deleger@inrae.fr](mailto:louise.deleger@inrae.fr)

## Abstract

Milk oligosaccharides are bioactive components that regulate the composition of the neonatal microbiota and exert immunomodulatory functions. Their beneficial effects depend on their structure. Numerous studies have shown intra- and inter-species variation in the structural composition and concentration of these compounds in mammalian milk, yet the biological significance of such variation remains poorly understood. Automated natural language processing methods are promising tools for extracting and gathering structured data from unstructured texts to get insight into the biological significance of milk oligosaccharide variation across mammals. These methods require training and evaluation on manually annotated text corpora. While annotated corpora exist for chemical substances, none are specifically designed for training natural language processing models to extract information on milk oligosaccharides.

To this end, we propose MilkOligoCorpus, a new gold standard for milk oligosaccharide composition in mammalian species. MilkOligoCorpus' annotation scheme is a rich entity/relation model designed to describe the diversity pattern of milk oligosaccharides according to female factor variability and to help better understand the structure-related function of milk oligosaccharides. MilkOligoCorpus consists of abstracts (15) and extracts (15) from 20 full text articles indexed by PubMed annotated with entities related to individuals, samples, oligosaccharides and oligosaccharide quantification linked by binary and n-ary relationships. To address data interoperability across disparate publications and databases, four terminological resources were also developed to assign unique identifiers to the entities, supported by external ontologies.

This paper presents the creation of the MilkOligoCorpus and its associated schema, along with the development of annotation guidelines and terminological resources. We also present experimental results obtained by baseline information extraction models on the corpus.

## Introduction

### Background

As the first food available to neonates in mammalian species, milk must meet their specific needs by providing ideal nutrition as well as non-nutritional bio-active components that serve physiological functions. Among the latter, milk oligosaccharides (MOs) have recently attracted increased interest regarding the wide range of potential benefits for short- and long-term mammalian health. These carbohydrates are not digested by host enzymes and reach the lower part of the gastrointestinal tract intact, where they regulate host microbiota composition and exert immunomodulatory function [1,2]. MOs are highly complex molecules, combinations of three to twenty monosaccharides and multiple linkages resulting in structurally complex matrices of linear and branched oligosaccharides. The specific functions of MOs depend on the structural organization of their molecules. For example, MOs containing  $\alpha$ 1-2-fucose motif inhibit the adhesion of the pathogen *Campylobacter jejuni* to the mouse gut [3] and enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells [4], whereas sialylated MOs have been shown to modulate the immune response [5].

Recent advancements in MO analytical technologies have allowed the investigation of oligosaccharides in the milk of numerous mammalian species [6]. These data have revealed a wide diversity in MO patterns, i.e., the abundance and richness of milk oligosaccharides in a specific species. This has led to a growing volume of scientific literature on this topic. Efforts have been undertaken to gather and consolidate literature information on the variability of inter-specific MO profiles. To date, two databases have been developed to explore MO profiles across mammals. MilkOligoDB [7] compiles MO structural diversity across mammals through the manual harvest of MOs from the literature, while the database developed by Jin et al. [8] records MO composition in 168 mammalian species. Both are exhaustive MO databases. However, they rely on manual curation of the literature, which is not suitable for processing the growing volume of biological data encompassing thousands of articles. In addition to species-specific variability [9], MO patterns also exhibit a variability related to intra-specific factors, including genotype [10] or breed [11,12], maternal physiology, i.e., duration since the end of gestation and number of gestations [13], course of lactation within a same individual [14], as well as extrinsic factors such as nutrition [15] or geography or season [16]. Understanding the biological significance of such variations in MO profiles is of importance to understand the structure-function link of MOs. That information is not collected or included in the above-mentioned databases.

This mass of data on associated or causal variability of the MOs structure patterns, spread in an increasing and disparate volume of heterogeneous scientific articles, makes it challenging

to carry out manual bibliographic queries and in-depth reading across the entire study area. Automatic Natural Language Processing (NLP) methods - especially methods that extract information from textual data and that allow to store them in a database for easy querying, reuse and sharing - are particularly well-suited to handle linguistic diversity and the increasing number of publications. They also assist in studying and understanding the associated or causal variability of MOs. The first step before using NLP-based information extraction methods is to build an annotation schema that translates the biological complexity of the variability of MO profiles and conceptualize the information model. A text annotation schema is designed to identify the significant entities of interest and establish relations between them. The information schema serves both to define the NLP information extraction objective and to establish the data storage model. Regarding entities, minimal information would include the quantity of a specific milk oligosaccharide structure found in the sample of a given species. Additionally, relevant information to convey this biological complexity must include all the female intrinsic and extrinsic factors influencing MO composition, such as the number of gestations the female has already had, the duration since the mother has given birth, and the breed of the female studied. Finally, an accurate and exhaustive analysis of the diversity of milk oligosaccharides identified among mammalian species must include experimental parameters since they can influence results interpretation. They include the number of individuals studied and the methodology of analysis. Milk oligosaccharide analysis can be carried out with several methods, i.e., instruments of measurement, products used to prepare samples, and techniques to analyze results. The precision of results depends on the chosen methods, resulting in variations in their interpretation. Therefore, it is recommended to clearly specify the sample analysis methodology [17]. The recognition in the document content of the relevant entities, i.e., named entity recognition (NER), their categorization with ontology classes, i.e., entity normalization (or entity linking), and the establishment of relations between them, i.e., relation extraction, to make it available in a structured and standardized format directly integrable in a database is further complicated with this disparate and large amount of information. Usual text annotation schema relationships are binary, they consist of two entities linked by a relation. However, to clearly reflect the intricacy of the information, we also need to consider relations linking more than two entities, which adds a degree of complexity.

Another important issue lies in the intricacy of MO molecules, notably the naming variations of these chemical compounds with significant typographical variants involving hyphens, brackets, Greek letters, or word order. For example, the well-known fucosylated oligosaccharides *2'-fucosyllactose* is also referred to by its abbreviation *2'-FL*, while its systemic name, following the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) nomenclature, is  $\alpha$ -L-Fucopyranosyl-(1→2)-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-D-glucose. Moreover, the nomenclature rules of the IUPAC are not always followed by authors, and chemical conventions used may differ between articles. For instance, Gopal et al. refer to *N-acetylneuraminic acid* as *NeuAc* when describing bovine milk composition [18], while Difilippo et al. use *Neu5Ac* in their analysis of pig milk [19]. To overcome naming variation, text

annotation has to rely on semantic resources and glossaries to normalize the entities to a unified semantic representation. This normalization (named entity linking) addresses the interoperability of the data across disparate publications and databases. In fact, although our primary data source is scientific literature, we acknowledge the importance of other datasets [20] where the format of the information can vary greatly.

Beside the construction of an annotation schema fitting the complexity of MO diversity pattern, the development of NLP methods in such complex cases requires training and testing on manually annotated text corpora. Annotated corpora help evaluate the ability of the information extraction methods to identify entity types (named entity recognition) and relations, and to unify entities with respect to an external reference. To the best of our knowledge, no such corpus is available in the domain of milk oligosaccharide composition.

The present work describes the development of an annotation schema that formalizes the biological problem in an entity/relation model. This schema provides a relevant and valuable basis for modeling MO diversity pattern according to intrinsic and extrinsic variability factors in females. Additionally, it contributes to a deeper understanding of the structure-related function of MOs in health. It also describes the creation of a gold standard corpus MilkOligoCorpus for training and evaluating named entity recognition and normalization methods, and relation extraction tools meant to extract MO composition from the scientific literature. Finally, it discusses the performance of baseline methods applied to the corpus to demonstrate its relevance for evaluating and training NLP methods and to highlight information extraction challenges.

## State-of-the-art on corpora and annotation models

Before undertaking the building of the corpus, we conducted a survey of existing corpora to ascertain the potential reuse of annotations for our information extraction purposes regarding the presence of oligosaccharides in mammalian milk.

### Chemicals

The primary entity type in our study is milk oligosaccharides. Few existing corpora include annotations for chemical compounds. Krallinger et al. provide a survey of the publicly available corpora [21]. The CRAFT (*Colorado Richly Annotated Full Text*) corpus includes annotations of compounds with ChEBI (*Chemical Entities of Biological Interest*) concepts and biological taxa with the NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) taxonomy [22]. However, the chemical type is described with a level of precision (e.g., subatomic particles, atoms, molecules) that is not suitable for our purposes, and the CRAFT sources were selected according to the *Mouse Genome Informatics* (MGI) group, which is not relevant to our milk analysis study. Other corpora are either unavailable or out of scope (e.g., GENIA [23], ChemEVAL [24]).

The ChemDNER corpus [21] was designed to provide extensive coverage of chemical compounds and drugs in the literature. The documents were selected from PubMed using general keywords. Its annotations include over 84,000 manually identified chemical mentions, corresponding to nearly 20,000 unique chemical name strings normalized by IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) nomenclature and InChI (*International Chemical Identifier*) for formulas. However, despite this broad coverage, the corpus contains very few mentions of oligosaccharides, and their sample types are not documented.

## Species

Most corpora with species annotations are related to biomedicine, focusing on human, animal models (e.g., mice, rats) and microbes. The S1000 corpus is dedicated to biodiversity surveys [25], with its protist subset containing 671 scientific articles and 1104 species annotations ranging from green plants to fungi. The low number of mammalian mentions and the absence of chemical annotations in S1000 render it irrelevant for our purposes. The *Bacteria Biotope* corpus [26] is dedicated to bacteria habitats and therefore contains many mentions of mammals related to positive or negative microbial flora. However, the mammalian mentions are not tagged with NCBI taxa, as required by our study.

## Geographical locations

The geographical location information holds minor importance for mammalian oligosaccharide literature. The relevance of geographical location stems from its linkage to mammalian data, a feature absent in any existing corpus. We consider ChemDNER, S1000, and *Bacteria Biotope* relevant for evaluating the generality of the named-entity methods but inappropriate for training in our specific study domain.

## Relationships

The relationships among chemicals, media, species, their physiological stages, and locations are specific to our research topic. Most corpora in the biology domain are heavily focused on human health, where such information has not been annotated. The absence of a relevant corpus for text mining studies on milk oligosaccharides motivated our work.

## Materials and methods

This section details the process of building MilkOligoCorpus, the gold standard corpus on milk oligosaccharides. It describes the selection of literature and external semantic resources for entity normalization and the annotation process. It also explains the information extraction methods selected to assess the suitability of the corpus and serve as baselines for the development of more advanced methods.

## Document selection

We formulated a query to retrieve articles about milk oligosaccharides from the PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) and WOS (<https://www.webofscience.com/wos>) bibliographic databases as they contain an extensive collection of fully open biological literature and the indexation make search efficient. The documents of MilkOligoCorpus were selected using the query in Table 1.

Table 1: PubMed query for the initial selection of documents (October 2022).

#	Search Query	Results
1	TI = (oligosaccharide* OR glycan*)	28720
2	AB = (oligosaccharide* OR glycan*)	58887
3	AK = (oligosaccharide* OR glycan*)	15729
4	#1 OR #2 OR #3	73135
5	TI = (milk OR "breast feed*")	120167
6	AB = (milk OR "breast feed*")	169285
7	AK = (milk OR "breast feed*")	58499
8	#5 OR #6 OR #7	227381
9	TI = (quantification OR composition OR content* OR concentration* OR structure*)	2519746
10	AB = (quantification OR composition OR content* OR concentration* OR structure*)	10797899
11	AK = (quantification OR composition OR content* OR concentration* OR structure*)	969925
12	#9 OR #10 OR #11	12111944
13	#12 AND #8 AND #4	1602
14	ALL = (fructose OR galacto-oligo* OR galactooligo* OR yogurt* OR cheese OR whey OR FODMAPS* OR fructo-oligo* OR fructooligo* OR "enzymatic synthesis" OR "enzymatic production" OR BSSL OR "nutritional yeast")	144993
15	TI = ("Infant formula*" OR galactosidase* OR "skim* milk" OR supplementation)	78829
16	((#13) NOT #14) NOT #15	1161
17	((((#13) NOT #14) NOT #15) AND Article OR Review Article OR Proceeding Paper OR Early Access (Document Types)	1134
18	((((#13) NOT #14) NOT #15) AND Article OR Review Article OR Proceeding Paper OR Early Access (Document Types) AND English (Languages)	1108

The first part of the query (lines 1 to 14) selects documents about milk oligosaccharides composition. Keywords were searched within the title (TI), abstract (AB) and author keywords (AK) to maximize the likelihood of capturing a diverse range of sources, including texts where the primary focus may not be the investigation of milk oligosaccharide composition. The Glycan keyword in the query was searched as a synonym of oligosaccharide. Keywords in line 10 were used to include descriptions of all types of milk oligosaccharides, which vary from simple lists of present structures to quantification.

The queries from lines 14 to 16 helped refine our research by excluding:

- Documents studying milk oligosaccharides in non-milk samples, such as yogurt or cheese. We target analysis of raw milk as any processing or intervention can potentially alter its composition;
- Documents about milk oligosaccharides but dedicated to other purposes such as the study of methods for synthesizing milk oligosaccharides;
- Documents with a broader study of carbohydrates, including sugar structures that do not belong to milk oligosaccharides.

No restriction in the publication timeframe was made to broaden our chance to obtain diverse articles. We, however, only considered certain types of documents: article, review article, proceeding paper or early access (document types). Additionally, we only included documents in English to avoid multilingual issues.

The query (18) was carried out in October 2022 and retrieved 1108 documents. A subset of 20 texts was manually selected for manual annotation as representative of a range of mammalian species and as covering the heterogeneity of writing styles and distinctive features. For instance, Albrecht et al. list the milk oligosaccharides discovered in a table [27], while Rostami et al. detail the findings directly in the full text [28]. Salcedo et al. mention the oligosaccharides by their composition [29], Urashima et al. refer to them by their structure [30], while Difilippo et al. use their names [19].

Because manual annotation is a time-consuming task, we decided not to annotate the full articles but to select paragraphs and sentences that were informative and included the most intricate examples, i.e. containing a maximum number of entities and heterogeneous data. The 20 articles were divided into 30 documents belonging to two types: (i) titles along with abstracts or (ii) extracts from full-text articles (see List\_of\_articles file in the repository <https://doi.org/10.57745/LFXGFO>). Extracts have variable lengths, from a single to a few paragraphs.

## Semantic resources

Our primary data source is scientific literature but multiple datasets and standards gather major information [7,8,20,31]. Entity normalization facilitates the integration of information from heterogeneous sources by mapping entity mentions to standard categories from

references when relevant, and assigning these mentions to the unique identifiers of these categories. This process gives a unified format for all entity types and enables users to perform queries based on a standard form independently of their name diversity. Therefore, we selected four external semantic resources and built four new resources for normalization (the latter are described in the Results section). The existing resources are: i) the *NCBI taxonomy* for *species* [32], ii) *Geonames* for *geographical locations* [33], iii) the *Livestock Breed Ontology* for *breeds* [34], and iv) *MilkOligoThesaurus* for *milk oligosaccharides names* [35].

The *NCBI taxonomy* and *Geonames*, frequently used for data indexing, cover our needs with their advanced referencing features. Regarding the *Livestock breed ontology*, although it covers a limited subset of species (buffalo, cattle, chicken, goat, horse, pig and sheep breeds) and breeds within one species, it remains the most comprehensive lexical resource for mammalian breeds available to date. Finally, the main issues in exploring literature to extract relevant information on milk oligosaccharide structure relate to the heterogeneity in the way authors refer to these molecules. Thus, normalization is highly required but no existing ontology was suitable for our task. Therefore, in preliminary work, we created the *MilkOligoThesaurus* [35] that we use here for milk oligosaccharide normalization. It gathers 245 unique oligosaccharide structures and includes a standardized name, associated with other information that can be extracted from the scientific literature, such as common synonyms and abbreviations, the monosaccharide composition, its formula in condensed form, and in abbreviated condensed form, the abbreviated systematic name, the systematic name, and the isomer group. *MilkOligoThesaurus* is accessible on the AgroPortal ontology repository <https://agroportal.lirmm.fr/ontologies/MILKOLIGO/> and on the *data.gouv.fr* repository <https://entrepot.recherche.data.gouv.fr/dataset.xhtml?persistentId=doi:10.57745/RA5DAC> in tabular, rdf and ttl format.

## Annotation process

### Annotation guidelines

The annotation guidelines provide the detailed instructions on how to perform text annotations. The guidelines document gives a definition of each entity, entity boundary criteria, and annotation rules, i.e., what should be tagged or not, and how to assign tagged elements to semantic resources. A wide range of examples is also depicted in the document to illustrate how to handle ambiguities and inconsistencies that may lead to annotation errors and discrepancies.

To ensure accessibility for individuals with diverse backgrounds, the document includes detailed explanations of each entity type. These guidelines are intended not only for annotators of the MilkOligoCorpus but also for adaptation and use for annotating other corpora or designing instructions in prompting methods.

The annotation lead, skilled in biological science, worked alongside with text and data mining experts to develop these guidelines essential for ensuring consistent annotation. The initial draft of guidelines, authored by a single individual, was refined through an iterative annotation process after being independently reviewed by four others.

The entire guidelines, with detailed instructions and extensive list of examples are provided in the repository (<https://doi.org/10.17180/94mt-v661>).

## **Annotators**

Two annotators with a background in biology (a PhD student expert in milk oligosaccharides, and a BS graduate with experience in manual annotation) performed the annotation. Consistency checking was performed by an NLP researcher expert in manual annotation curation.

## **Annotation process**

Annotation was conducted in three stages. In the first stage, the annotator expert in milk oligosaccharides annotated all entities and binary relations from the corpus. In the second stage, the second annotator reviewed the annotations and added normalization annotations (linking entities to entries from the semantic references) as well as n-ary relations (grouping binary relations describing the same event). Finally, we applied automatic scripts to check annotation consistency and flag potential errors, which were then reviewed manually by the NLP expert. Double-blind annotation was not performed because of time constraints, so we did not measure inter-annotator agreement.

Detected errors included missing mentions (mentions annotated in some documents but not in others), type mismatches (identical mentions tagged with different entity types), and missing or erroneous normalization annotations (with no or unknown semantic reference identifiers).

## **Annotation tools**

The annotators used two different tools to perform the annotation. The first annotator used the *tagtog* tool [36] (<https://docs.tagtog.com/>), which is easy to set up and use, and so more suitable for first-time annotators. The second annotator and the NLP reviewer both had experience in manual annotation and used the AlvisAE tool [37], which provides advanced functionalities such as n-ary relation annotation and entity normalization.

## **Information extraction methods**

We designed the MilkOligoCorpus to provide reference data to train and evaluate automatic information systems. In order to demonstrate the corpus suitability for this purpose, we evaluated baseline methods through three main information extraction steps: entity recognition, entity normalization (also called entity linking), and relation extraction. As

methods, we chose common approaches based on lexicons and rules as well as recent machine-learning techniques. The purpose was to establish baseline performance, evaluate task difficulty and assess the usability of the corpus.

## Entity recognition

Entity recognition aims to identify textual mentions of given types relevant to a given domain. Thus, here, entities are related to the topic of mammalian milk oligosaccharides. We designed two baseline models to recognize the entities defined in MilkOligoCorpus: a simple rule-based baseline and a machine-learning (ML) -based baseline.

The rule-based approach leverages semantic resources, such as lexicons and thesaurus, and a set of simple regular expressions. It is implemented using the AlvisNLP corpus processing engine (<https://github.com/Bibliome/alvisnlp>). A basic preprocessing pipeline based on the Stanza natural language analysis package (<https://stanfordnlp.github.io/stanza/>) is also used for sentence segmentation, tokenization, lemmatization and general domain entity recognition (e.g., times, cardinals...).

A common ML-based approach to recognizing entities is to fine-tune an existing transformer-based language model to classify tokens into the target entity types. Here, we use the BioBERT cased model [38], a model specific to the biomedical domain. We fine-tuned BioBERT on MilkOligoCorpus to classify all entity types at once, in a 5-fold cross-validation setting with 5 random initializations (random seeds) to take into account the variability due to the stochastic nature of neural language models. For geographical locations, which are common in both general-domain and specialized-domain corpora, we also evaluated an existing model from the Stanza package (the English-language NERProcessor, <https://stanfordnlp.github.io/stanza/ner.html>) trained to recognize general-domain entities (including locations), in addition to fine-tuning our own model.

The code for our experiments is released at <https://forgemia.inra.fr/holooligo/rb-pipeline> and [https://forgemia.inra.fr/holooligo/ner\\_holooligo](https://forgemia.inra.fr/holooligo/ner_holooligo).

## Entity normalization

Entity normalization consists in aligning textual mentions of entities within a corpus with their corresponding entries (i.e., class, category) in a knowledge base or lexicon. Biomedical entities have the particularity that many of them can be referred to by different textual forms (e.g., both "Triose C" and " $\beta$ 6'-Galactosyllactose" refer to the same oligosaccharide) while similar textual forms can correspond to different entities. It can therefore be challenging to accurately map the textual mention to the correct class. We chose BioSyn as machine-learning baseline for entity normalization because it achieved good performances on similar tasks. The BioSyn framework [39] was developed to address this challenge. BioSyn relies on a pre-trained language model that is fine-tuned using synonym marginalization, a strategy that incorporates synonym sets during training to learn robust representations for entity linking. We also

implemented a lexicon-based baseline that performs simple string matching between entity mentions in the text and the labels of the entries from the semantic references with which these entities have to be normalized. The code for our experiments is released in the following repositories:

<https://forgemia.inra.fr/holooligo/rb-pipeline>,  
<https://forgemia.inra.fr/bibliome/geonorm>, and  
[https://forgemia.inra.fr/holooligo/nen\\_holooligo](https://forgemia.inra.fr/holooligo/nen_holooligo).

## Relation extraction

Relation extraction is the task of detecting relationships between given entities in a text and classifying them. Relation types and argument types for these relations are predefined according to the domain. Relations may involve two entities (binary relations) or more than two entities (n-ary relations). From an information extraction viewpoint, binary relation extraction is a more common and less challenging task than n-ary relation extraction. For our baseline experiments, we only tackled the task of oriented binary relation extraction.

As is typical for this task, we look at the problem of relation extraction as a sentence classification task and use a machine-learning baseline. We augment the original text with special characters that delineate the boundaries of the reference named entities and predict whether the delineated entities are in relation with each other. We use REBERT (<https://forgemia.inra.fr/bibliome/re-bert>), a tool that fine-tunes various language models specifically for relation extraction. We use the BioBERT model as the foundation model, as for our entity recognition baseline. The code for our experiments is released at [https://forgemia.inra.fr/holooligo/brel\\_holooligo](https://forgemia.inra.fr/holooligo/brel_holooligo).

The following sentence from Rostami et al. [28] gives an example of the input given to the relation extraction method. There are two entities, the oligosaccharide name mention "3'SL" and the sample type "milk":

[Example 1] “<< 3'SL >> was found to be by far the most prominent dog @@ milk @@ oligosaccharide.”

The relation extraction task is to predict whether there is a relation between the two entities "3'SL" and "milk". When the annotation schema only defines one possible relation type for every pair of compatible entities, then the relation type can be deduced from the argument types, and thus there is no need to specify the type of the relation. From Example 1, the only possible relation between an *oligosaccharide name* and a *sample type* is the relation *composed of* (see the Results section below for a list of all relation types). This means that if the method predicts the correct label, "yes, there is a relation", then the system will be able to deduce from the entity types that the relation type is *composed of*.

## Results

In this section, we present our annotation schema, the statistics of the annotated corpus, and the experimental results obtained with the information extraction methods.

## Annotation schema

We developed an annotation schema including entities and relations between entities. Semantic resources associated with some entities are proposed for concept normalization. The relations include binary and n-ary relations. The schema was built through an iterative process while performing the annotation tasks presented in the annotation process part of this article. The full version of the schema is the result of restructuring steps in the course of the annotation process (Fig. 1).

## Entities

Studies on mammalian milk composition include experiment records such as the number of individuals sampled, the geographical location where the sampling took place, the sampling methods, and the procedures and devices used to analyze the samples. Some studies give detailed metadata on female samples, namely breed, stage of lactation and number of gestations (primiparous, multiparous). Initially, the information included only six entity types: animals, characteristics (i.e., lactation stage, parity or age), oligosaccharides, geographical location, sample, and methodology. Several entity types have been trimmed down by removal or merging, while others have been separated into distinct entities to cover a wide range of relevant information while avoiding ambiguities with clearly distinct entities.

Originally, *species* mentions were included in a broader entity type, “animals”, including breeds when specified. We decided to introduce a separate *breed* entity type. *Breed* is mainly referred to in articles dealing with domesticated species (farm or domestic animal). The *Livestock Breed Ontology*, presented in the methodology, was the only lexica for breed terms, however, it is still limited to certain species (buffalo, cattle, chicken, goat, horse, pig and sheep breeds). We thus restricted the annotation of the breed type to domesticated species.

Similarly, female metadata were initially gathered in a large entity type including all characteristics. A first split resulted in the creation of the entity type *female physiological stage* along with an entity type for the age of the female. The physiological stage indicates how many times the female has already been in gestation, and can significantly impact the MO concentration [13]. After several annotations we decided to create two distinct entity types, *lactation stage* and *postpartum age* instead of a unique type for the age to avoid ambiguity. While *postpartum age* indicates a clear period of time, the entity *lactation stage* is a specific step during lactation. The exact duration depends on the species studied; colostrum last only 48h for rabbits while it extends up to 30 days in giant pandas [40].

Finally, milk oligosaccharides are complex structures of core molecules composed of three monosaccharide building blocks that can be repeated up to 25 times but also decorated with

two other monosaccharides. They are typically classified in three categories according to this structure, *neutral* if the structure is only composed of the core molecules and *sialylated* or *fucosylated* depending on the monosaccharide decorative. Two other categories are also used, based on the chemical linkages between the monosaccharides, *type I* or *type II*. The precision of milk oligosaccharide composition varies depending on the methodology used. Some analyses are used to identify as many structures as possible, e.g. shotgun-MS analysis, while others cannot distinguish between isomers - molecules with the same chemical composition and mass but different arrangements of atoms - such as MALDI-TOF-MS [17]. As a result, several studies have been unable to clearly identify specific molecules but have instead detected characteristic elements of these molecules, classifying them into broader categories. Given this, we have decided to add a distinct entity type for oligosaccharide types.

The methodology also influences quantitative characterization. Initially gathered in one entity, we decided to create three milk oligosaccharide quantification entities. The *absolute quantification* includes indication regarding the total concentration of oligosaccharide, while the *relative quantification* is the proportion of an oligosaccharide compared to the total milk oligosaccharide. Finally, the *richness* gives the number of an oligosaccharide or a group of milk oligosaccharides.

In the end, the annotation schema consists of fourteen entity types that we classified into three groups based on the aspect they refer to: (i) Individual-related; (ii) Sample-related; (iii) Oligosaccharide-related.

The complete list of entities is available in Table 2, along with the semantic resources described in the following paragraph.

Table 2: Description of the 14 entities of the annotation schema. Semantic normalization refers to semantic resources used to normalize the entities. "Indiv.-related" stands for "individual-related" and "Oligo-related" stands for "Oligosaccharide-related".

Entity group	Entity type	Definition	Semantic normalization	Text examples
Indiv.-related	Species	Name of mammalian species (scientific name, current name, abbreviations ...)	NCBI	Porcine, dogs, mongoose lemur, bovine ...
Indiv.-related	Breed	Subclass of species	Livestock breed ontology	Dutch Landrace, Labrador Retriever ...
Indiv.-related	Geography	Indicates where the samples are from	Geonames	Cork, County Tipperary, Washington DC ...

Indiv.-related	Female physiological stage	Lactation parity that indicates the number of gestation mothers have already had	Female parity thesaurus	Gilt, bred at least once ...
Indiv.-related	Individual number	Number of individuals sampled in letter or numeric forms	No	335, Three ...
Sample-related	Sample type	Refers to the samples used during the experimentation	Sample thesaurus	Milk, pooled, mixed ...
Sample-related	Lactation stage	Type of milk based on the period of lactation	No	Mature, early lactation, colostrum ...
Indiv.-related	Postpartum age	Duration in number since the mother has given birth	Number to convert in days	Day 10, 96 days postpartum ...
Sample-related	Methodology of analysis	Procedures and devices used to analyze the samples	MO methods thesaurus	HPAEC-PAD, NMR, Q-TOF-MS ...
Oligo-related	Oligosaccharide type	Neutral, fucosylated, sialylated, acidic, type I, type II	Oligo type thesaurus	Fucosylated, type II, Sia-MOS ...
Oligo-related	Oligosaccharide name	One of the Oligosaccharide's thesaurus mentions	MilkOligoThesaurus	2'-Fucosyllactose, LNFP V, Gal(b1 – 3)Gal(b1 – 4)Glc ...
Oligo-related	Absolute quantification	Concentration of an MO (Number in g/L)	No	30 mg/L, 19.3 +/- 2.9 g/L ...
Oligo-related	Relative quantification	Proportion of an MO (Number in %)	No	2.5 %, 20-52 % ...

Oligo-related	Oligosaccharide richness	Number of all the MO, a single MO or a group of MOs	No	Eight, 29 ...
---------------	--------------------------	-----------------------------------------------------	----	---------------

## Semantic resources

We used semantic resources to normalize the relevant entities. As described in the Material and Method section, we identified existing semantic resources to normalize *species*, *geographical locations*, *breeds*, and *milk oligosaccharide names*. Additionally, we also developed our own resources to normalize the entities for which no suitable existing resource was found, i.e., *female physiological stage*, *sample type*, *methodology of analysis* and *oligosaccharide type* (Table 2). We created four glossaries, the *Female physiological stage thesaurus*, the *Sample thesaurus*, the *MO methods thesaurus* and the *Oligo type concepts*, to overcome the lack of reference sources for the *female physiological stage*, the *type of sample* studied, the *methodology* used for the analysis, and the *oligosaccharide type* respectively.

The *Female physiological stage thesaurus* gathers terms to designate the physiological stage of the female i.e., the number of gestation of females. Primiparous and multiparous are common names for parity, but we also found phrasal forms (“Bred for the first time”) or the number of parity (“x”-parity). Besides, porcine species have specific words, synonyms for pig, that indicate the parity. Sows are multiparous pigs, whereas gilts are primiparous pigs. These two physiological stages, primiparous and multiparous, are compiled in a 6-column tabular file including an identifier for each stage, synonyms, and specific characteristics relevant to the pig species. The *Female physiological stage thesaurus* is accessible in the repository <https://doi.org/10.57745/LFXGFO>.

This study focuses on the analysis of milk in its raw form as any intervention can potentially alter its composition. However, in some experiments, it is necessary to combine samples from multiple individuals. This is usually specified in the article and must be considered when comparing results across different experimental designs. Given the variability in formulation (adverbs, verbs, nouns) we decided to standardize it in the *Sample thesaurus*. The two types of samples, milk or pooled milk, are compiled in a 7-column tabular file that includes the identifier of the type of sample, and synonyms. The *Sample thesaurus* is accessible in the repository <https://doi.org/10.57745/LFXGFO>.

A third thesaurus is used to normalize the textual mentions of analysis methodology. The *Chemical Method Ontology* (CHMO) lists instruments and methods to collect data and prepare material in chemical experiments. It is an accurate ontology but it is too broad for our field of interest. Milk oligosaccharides analysis relies on a few specific methodologies which we have compiled into a concise thesaurus called the *MO methods thesaurus*. The forty-two methodology types are compiled in a 6-column tabular file that associates to each methodology an identifier, abbreviation, synonyms, the doi from the article where the

methodology was mentioned, and the identifier from the CHMO database when available to enable data linking. The *MO methods thesaurus* is accessible in the repository <https://doi.org/10.57745/LFXGFO>.

The oligosaccharides' types refer to the usual classification used to categorize milk oligosaccharides. This classification is based on the structure of the molecules. The *Oligosaccharide type concepts* lists the terms used and *sialylated* is the only type that can be referred to with a different name, *acidic*. The *Oligosaccharide type concepts* is accessible in the repository <https://doi.org/10.57745/LFXGFO>.

Finally, entities referring to quantification, i.e., *individuals' number*, *absolute quantification*, *relative quantification*, and *oligosaccharide richness*, do not require semantic resources for normalization. Those numerical entities must only have homogenized units of measure.

## Relations

Information extraction aims to extract relevant knowledge from unstructured textual data to make them available in a structured format. To associate the MO structure pattern, i.e., the abundance and richness of milk oligosaccharides in a specific species, isolated entities alone are insufficient. It is necessary to define the relationships between them to accurately describe their association. The following sentence from Gopal et al. [18] gives an example [Example 2] of entities in relations, where the *relative quantification* entity, 50 %, is meaningful only when linked to the oligosaccharides it described, which in turn are relevant only when linked to the *species* in which they are found.

[Example 2]: “Together, 3'- and 6'-sialyllactose account for more than 50 % of the total oligosaccharides present in bovine”

Relations can involve two entities (binary relations) or multiple ones (n-ary relations). In our annotation schema, we defined eleven types of binary relationships, that are listed in Table 3 with the types of the arguments involved. Examples for each relation type are available in the guidelines document. We have chosen to focus on positive relations and not to annotate negated relations (such as in “*Isoglobotriose was not found in the polar bear colostrum*”). Such negations will be treated as negative examples when training automatic methods.

Table 3: Characteristics of the binary relations with the definition and argument entity types.

Relation	Argument 1	Argument 2	Definition
Is a	Species	Breed	Relates the species to its breed
From	Species	Geography	Relates the species to its location
	Sample Type	Geography	Relates the sample to its location

	Lactation Stage	Geography	Relates the lactation stage to its location
Number of	Breed	Individual Number	Relates the breed to the number of individuals
	Species	Individual Number	Relates the species to the number of individuals
Has a physiological stage	Species	Female Physiological Stage	Relates the species to its physiological stage
Has given birth since	Species	Postpartum Age	Relates the species to the period since when she has given birth
Has produced	Species	Sample Type	Relates the species with the milk
	Species	Lactation Stage	Relates the species with the milk
Collected at the stage	Sample Type	Lactation Stage	Indicates the stage of lactation at the time of sampling
Collected x days after parturition	Lactation Stage	Postpartum Age	Indicates the duration between the parturition and the collection of the samples
	Sample Type	Postpartum Age	Indicates the duration between the parturition and the collection of the samples
Analyzed by	Lactation Stage	Methodology of analysis	Indicates the methodology used to analyze the samples
	Sample Type	Methodology of analysis	Indicates the methodology used to analyze the samples
Composed of	Sample type	Oligosaccharide type	Indicates the type of oligosaccharide found in a sample
	Lactation stage	Oligosaccharide type	Indicates the type of oligosaccharide found during a specific lactation stage
	Sample type	Oligosaccharide name	Indicates the oligosaccharide found in a sample

	Lactation stage	Oligosaccharide name	Indicates the oligosaccharide found during a specific lactation stage
Found in quantity	Oligosaccharide type	Absolute quantification	Indicates the absolute quantity of a type of oligosaccharide
	Oligosaccharide type	Relative quantification	Indicates the relative quantity of a type of oligosaccharide
	Oligosaccharide type	Oligosaccharide richness	Indicates the number of a type of oligosaccharide
	Oligosaccharide name	Absolute quantification	Indicates the absolute quantity of an oligosaccharide
	Oligosaccharide name	Relative quantification	Indicates the relative quantity of an oligosaccharide
	Oligosaccharide name	Oligosaccharide richness	Indicates the number of an oligosaccharide

Given the definitions of the relationships *from*, *composed of* and *found in quantity*, the argument types are interchangeable. The *from* relation can connect a *geography* entity either to *species*, *sample type* or *lactation stage* entities, depending on the context. For relations involving milk oligosaccharide entities (*composed of* and *found in quantity*), the variation arises from differences in the precision of the molecule details i.e., whether the study specifies the exact molecule names or only the type, and in quantification, distinguishing between the exact number of molecules or a relative quantity.

Regarding the relations *number of*, *has produced*, *collected x days after parturition* and *analyzed by* we decided to select interchangeable argument types based on the distance between arguments. The arguments to include in the relations were chosen after consideration of the location of the entity mentioned in the text. Relation extraction (RE) methods typically give better performance when entities are close by in the text. However, critical relations may occur between entities mentioned in separate and sometimes very distant sentences. In fact, to avoid redundancy authors do not always repeat the information already stated. For instance, in Salcedo et al. [29] the relation *composed of* links “milk” and “fucosylated” located in two distinct sentences [Example 3]:

[Example 3] “*Porcine milk* had lower OS diversity [...] In agreement with previous studies, only 3 fucosylated OS were identified.”

Similarly, in Urashima et al. [41] the relation *analyzed by* includes the *methodology of analysis* (“gel filtration and preparative thin layer chromatography”) and the *sample studied* (“milk”) which is mentioned in the previous sentence [Example 4]:

[Example 4] “Carbohydrates were extracted from high Arctic harbour seal milk, *Phoca vitulina vitulina* (family Phocidae). Free neutral oligosaccharides were separated by gel filtration and preparative thin layer chromatography [...].”

We chose to annotate cross-sentence relations between entities occurring in the same paragraph and not further away. However, to simplify the task for very distant entities, we decided to include flexible relations where one argument type may be replaced by another one close in meaning, such as in the *has produced* relation where the entity type *lactation stage* can be used instead of the entity type *sample type*. This flexibility does not provoke disparities.

Furthermore, considering the number of entities to be extracted, binary relations may not be sufficient to capture the information unlike n-ary relations that link more than two entities. The sentence in example 5 gives an example of MO (referred to as OS in example 5) quantities measured in the milk of different species where four arguments must be linked to fully capture the meaning [42].

[Example 5]: “Approximately 29 different OS were identified in porcine milk, compared to 40 in bovine milk and >130 in human milk.”

In this sentence, we need to establish three 4-ary relations indicating the quantity of milk oligosaccharides in the species: (i) 29 MOs in porcine milk; (ii) 40 MOs in bovine milk; (iii) 130 MOs in human milk.

Since, “OS” is stated only once, a relation extraction method relying solely on binary relations cannot accurately determine the number of MOs present in the different species. It would link all numbers, 29, 40 and >130 to OS, the latter being related to milk, itself linked to porcine, bovine or human. We cannot simply merge the binary relations because it would not indicate the number of MOs associated with the respective species.

N-ary relations are thus an essential part of our annotation schema. Fig 1 is a simplification of our annotation schema with entities and relations organized in hierarchies based on the types of lines representing the relations. We have grouped entities by theme: (i) Individual-related entities are in blue; (ii) Sample-related entities are in orange; (iii) Oligosaccharide-related entities are in green.

As the number of arguments increases, automatically extracting relations becomes even more challenging. Therefore, we have prioritized the relations to be extracted, ensuring that efforts

are primarily focused on the key relations of interest. These relations are framed in Fig 1 by “Main relations of interest”.

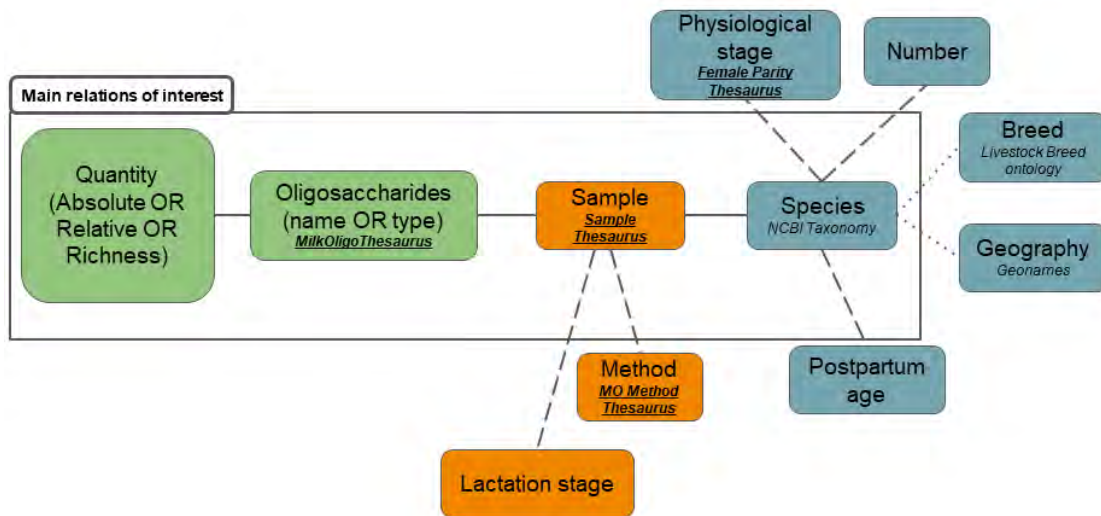


Fig. 1: Simplified version of the annotation schema. Colors indicate the classification of entities in the three themes described above, semantic resources are in italic with proprietary glossaries in bold and underlined. Solid lines indicate priorities relations, dash lines are used for relations of minor priorities, dot lines represent the lowest-priority relations.

The entire schema represents the maximal n-ary relation and each subgraph is a potential relation. The main relations of interest contain four entities: *species*; *sample*; *oligosaccharides* and *oligosaccharide quantities*. This 4-ary relation contains the central biological information to describe MO patterns in mammalian species. Entities linked by dash lines bring a higher level of detail.

The two 5-ary relations in the sentence below [Example 6] from Rostami et al. [28] include detailed information on the *species*, *postpartum age* or *lactation stage* which indicate relevant biological information regarding the evolution of MOs during the course of lactation within a same individual. The extraction of this information is a key to understanding the biological significance of such variations in MO profiles.

[Example 6]: 3'SL was found to be by far the most prominent dog milk oligosaccharide. In the first days of lactation it was present at levels around 7.5 q/L (12 mM), which dropped rapidly to approximately 1.5 q/L at 10 days of lactation.

Finally, we estimated that *geography* and *breed* represent the least critical information to extract. While they provide relevant information, these entities appear less frequently in texts and add complexity to the n-ary relation extraction task. As shown in Example 7 below from [43], a 6-ary relation, including *species*, *oligosaccharide name*, *geography*, *sample*, *postpartum age*, and *oligosaccharide absolute quantification*, is necessary to address the differences in human MO (HMO in Example 7) concentration according to the *postpartum age*.

[Example 7]: “A decrease ( $P < 0.05$ ) in HMO concentration was observed during the course of lactation for the US mothers, corresponding to 19.3 +/- 2.9 g/L for milk collected on postnatal day 10, decreasing to 8.53 +/- 1.18 g/L on day 120 (repeated measures;  $n = 14$ ).”

In many cases, n-ary relations are necessary to resolve ambiguities and extract the most detailed information possible. The annotation schema takes into account the challenge of n-ary relation extraction by prioritizing information. This prioritization does not exclude entities but instead establishes a hierarchy in cases of complex extraction aiding decision-making when necessary. We identified the key milk oligosaccharides information of scientific relevance to support the development of automatic methods which will be the focus of development and training efforts.

## Corpus

The resulting corpus is a collection of 30 documents annotated (15 abstracts and 15 extracts from full text from 20 publications) with 3626 entities, 2663 binary relations and 1927 n-ary relations. It contains 29318 tokens (words) and 933 sentences (as computed by the Stanza tool used for information extraction). The corpus is available in the following repository: <https://doi.org/10.57745/LFXGFO>. Fig. 2 gives an example of a text extract from the corpus (from Rostami et al. [28]) and of the knowledge derived thanks to the annotation, formalized as a knowledge graph that shows typed and normalized entities in relation with each other.

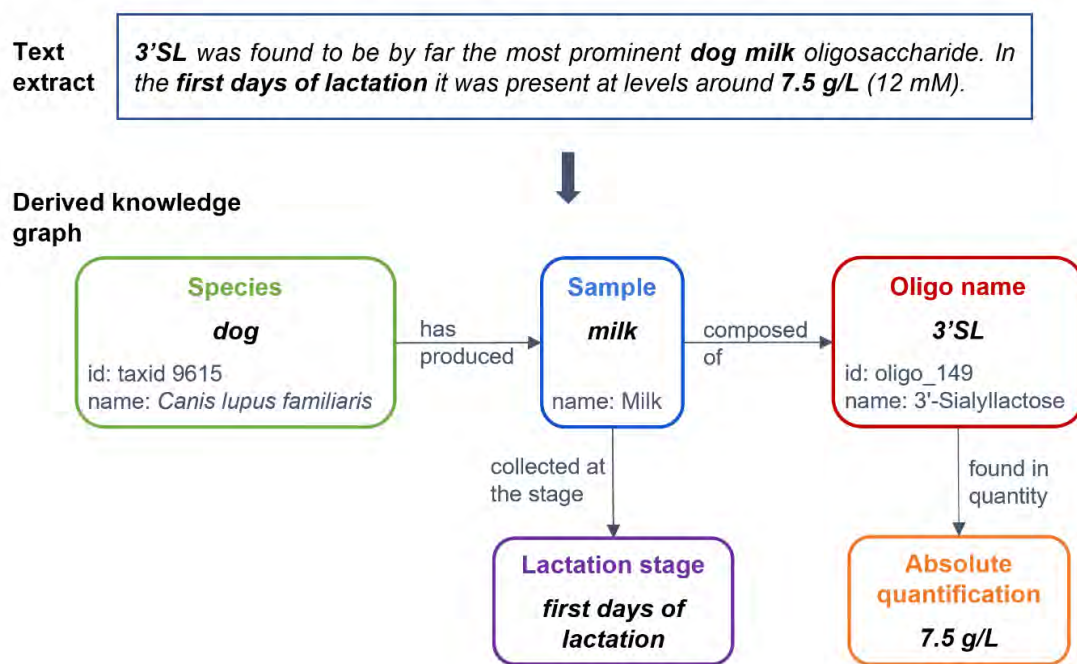


Fig. 2: Example of a text extract with its derived knowledge graph. Typed entities are linked to each other through the defined relations. Normalization (identifier and/or name of the assigned concept from the relevant semantic resource) is also provided when applicable. The entity type names ‘oligosaccharide name’ and ‘sample type’ are shortened as ‘oligo name’ and ‘sample’ in the graph.

Table 4 shows the number of occurrences of entities of each type, the number of distinct surface forms, and the ratio between the number of distinct forms and the number of

occurrences. This ratio is an indicator of the variability of each entity type and thus the expected difficulty to recognize them automatically. The most common entity type is *oligosaccharide name*, which is expected because this entity type is central to the MilkOligoCorpus. Nevertheless, the variability of *oligosaccharide name* entities is relatively low. This may seem surprising since molecule names tend to show a lot of variability, however, at least 254 occurrences among 913 are very generic terms, like “HMOs”, “PMOs”, or “oligosaccharides”. *Sample type* entities show an extremely low variability, indeed, 98% of occurrences have the form “milk” or a trivial variation, like “Milk”, or “milks”. The same phenomenon can be observed for *lactation stage* for which 45% of occurrences are “colostrum”, and for *female physiological stage* where 83% of occurrences are “gilt”. The most variable entities are those of types that represent numeric values: *postpartum age*, *oligosaccharide richness*, *relative quantification*, *absolute quantification*. Indeed, each distinct number is counted as a different form. On the other hand, the high variability of *geography* is due to the high number of different places mentioned in the corpus.

Table 4: Statistics of each entity type in the MilkOligoCorpus.

Entity Type	Number of occurrences	Number of distinct forms	Ratio
Oligosaccharide name	913	277	0.30
Species	754	100	0.13
Sample Type	635	8	0.01
Oligosaccharide type	293	68	0.23
Lactation stage	289	35	0.12
Postpartum Age	196	132	0.67
Oligosaccharide richness	134	59	0.44
Methodology of analysis	84	61	0.73
Relative quantification	79	61	0.77
Geography	64	46	0.72
Female Physiological Stage	59	8	0.14
Individual Number	47	20	0.43
Breed	45	25	0.56
Absolute quantification	34	30	0.88
	Total: 3626	Average: 66.43	Average: 0.44

Table 5 presents the breakdown of binary relations by type. *Composed of* and *has produced* are by far the most frequently occurring binary relations. The prevalence of these two binary relation types reflects the fact that, in the annotation schema, their arguments belong to the most common entity types: *oligosaccharide name*, *oligosaccharide type*, *species*, *sample type*.

Table 5: Statistics of each binary relation type in the MilkOligoCorpus.

Relation type	Number of occurrences
Composed of	988

Has produced	810
Found in quantity	241
Has given birth since	159
Collected at the stage	139
From	80
Analyzed by	77
Number of	56
Collected x days after parturition	50
Is a	49
Has a physiological stage	14
Total	2663

N-ary relations are built from the aggregation of binary relations pertaining to the same knowledge or event. Table 6 shows the distribution of n-ary relations by arity. Arity is the number of arguments in the relation. An arity of 2 indicates a binary relation that has not been aggregated. Out of 2663 binary relations, 18% are not aggregated with other relations. Among the n-ary relations of arity above 2, 87% are ternary or quaternary relations. Higher arity relations are rare.

Table 6: Arity statistics for n-ary relations.

Arity	Number of relations
2	470
3	796
4	475
5	141
6	42
7	1
Total	1925

## Experimental results

We report the performance of the baseline methods on MilkOligoCorpus for the three information extraction tasks, entity recognition, normalization, and relation extraction. We use standard evaluation metrics: precision, recall and F-score for entity recognition and relation extraction, and accuracy for entity normalization. Rule-based methods were evaluated on the corpus as a whole since there was no tuning of these methods. On the other hand, the machine-learning based methods required fine-tuning and were trained and evaluated using a cross-validation setting with the corpus divided into separate training and evaluation sets.

## Entity Recognition: Rule-based methods.

Table 7 shows the performance of the rule-based approach. Overall, the baseline achieves satisfactory performance, particularly for entity types such as *lactation stage* and *female physiological stage*, which are well-covered by the lexicons (Table 2). Similarly, *oligosaccharide names* and *types*, as well as mammal *species* are identified effectively. For *species*, a significant disparity is observed between precision and recall. This discrepancy stems from the absence of certain vernacular names (e.g., "sow" or "porcine") or common terms (e.g., "mothers") from the lexicon. These frequent terms account for the relatively low recall for this entity type.

For *breeds*, the baseline relies on the *Livestock Breed Ontology*, which focuses exclusively on livestock species (e.g., cattle, chicken) and does not cover other mammalian species found in the corpus, which explains the low performance.

Unsurprisingly, entities with a high distinct-form-to-occurrence ratio, as shown in Table 4, tend to exhibit lower performance with this simple lexicon-based baseline. Entities involving numerical values, such as *oligosaccharide richness* or *number of individuals*, are particularly challenging to detect accurately without introducing excessive noise. This is true as well for the mentions that denote *methodology of analysis*, where the variation in terminology is not comprehensively captured by the thesaurus that we used.

It should be noted that we did not use a lexicon-based approach for *geographical* entities, since the *GeoNames* lexicon contains too many ambiguous names that may be confused with other words. For instance, *GeoNames* includes location names like "Milk" which in some rare contexts may refer to the name of a geographical place, but most likely never in our corpus. An approach relying on lexicon matching would certainly give extremely poor results, so we did not attempt it.

Table 7: Comparison of F-score, precision and recall measures across entity types for rule-based named entity recognition (NER). The evaluation mode is strict, requiring exact entity boundary matching with the reference.

Entity Type	F-score	Precision	Recall
Overall (Micro average)	0.74	0.82	0.67
Sample Type	0.98	0.98	0.99
Species	0.73	0.95	0.59
Lactation Stage	0.82	0.89	0.75
Oligosaccharide Type	0.62	0.65	0.60

Oligosaccharide Name	0.79	0.85	0.73
Postpartum Age	0.29	0.53	0.20
Oligosaccharide Richness	0.25	0.68	0.16
Individual Number	0.38	0.75	0.26
Relative Quantification	0.45	0.41	0.52
Methodology of Analysis	0.34	0.31	0.38
Breed	0.29	0.31	0.27
Absolute Quantification	0.58	0.64	0.53
Female Physiological Stage	0.98	1	0.97

### Entity Recognition: Machine learning methods

The results of our fine-tuned BioBERT model are shown in Table 8. They are computed as the averages over the 25 runs (5-fold cross-validation with 5 random initializations), with the standard deviation reported as well. The main entities (*species*, *sample type*, *oligosaccharide type* and *oligosaccharide name*) are well-identified, with the exception of quantities (*relative quantification* and *absolute quantification*). *Postpartum age*, *breed* and *geographical location* types also yielded low scores. There are a number of possible explanations. Quantities are dependent on the presence of *oligosaccharide* entities, which makes it harder for the model to learn, especially when the number of examples is relatively small. *Postpartum ages* are often discontinuous entities, which are not fully handled by the model. *Geographical locations* and *breeds* are rare in the corpus and have variable forms (Table 4). For *methodology of analysis* entities, the score is average (0.57 F-score). These entities are variable, infrequent, and may have long and complex syntactic structures (e.g., “*ultraperformance liquid chromatography–hydrophilic interaction liquid chromatography with fluorescence detection coupled to quadrupole time-of-flight MS*”), which explains this moderate performance. Methodology information is important for the characterization of MOs (monosaccharide identification and linkage). Therefore, biologists should be aware that the data obtained by the NLP pipeline must be manually checked to take into account the methodology used. Only the score for *physiological stage* type is extremely low. The model is unable to learn this entity type. This phenomenon can be attributed to two main reasons: the low occurrence frequency

of this entity in the corpus and, most importantly, the fact that there are many instances where the same span is both of a *female physiological stage* type and a *species* type for example, "gilt" refers to a female pig (*species*) that has not yet given birth to piglets (*female physiological stage*). This case is not handled by our baseline method that tags mentions by a single type.

Table 8: Comparison of f-score, precision and recall performance across entity types obtained with the machine-learning method. The evaluation mode is strict, requiring exact boundary matching with the reference.

Entity Type	F-score	Precision	Recall
Overall (Micro average)	0.75 ± 0.02	0.74 ± 0.03	0.76 ± 0.04
Sample Type	0.89 ± 0.05	0.96 ± 0.05	0.84 ± 0.08
Species	0.88 ± 0.04	0.84 ± 0.07	0.92 ± 0.05
Lactation Stage	0.80 ± 0.09	0.79 ± 0.09	0.82 ± 0.10
Oligosaccharide Type	0.69 ± 0.05	0.68 ± 0.09	0.72 ± 0.07
Oligosaccharide Name	0.77 ± 0.04	0.76 ± 0.05	0.79 ± 0.05
Postpartum Age	0.41 ± 0.12	0.37 ± 0.11	0.45 ± 0.11
Oligosaccharide Richness	0.61 ± 0.14	0.66 ± 0.18	0.62 ± 0.19
Number of Individuals	0.75 ± 0.19	0.90 ± 0.16	0.69 ± 0.23
Relative Quantification	0.39 ± 0.16	0.34 ± 0.17	0.59 ± 0.28
Methodology of Analysis	0.57 ± 0.14	0.52 ± 0.13	0.63 ± 0.16
Breed	0.43 ± 0.35	0.48 ± 0.38	0.42 ± 0.36
Absolute quantification	0.33 ± 0.24	0.29 ± 0.27	0.48 ± 0.36
Geography	0.39 ± 0.14	0.44 ± 0.17	0.39 ± 0.15
Female Physiological Stage	0.05 ± 0.20	0.08 ± 0.28	0.05 ± 0.18

As mentioned in the Methods section, we also evaluated Stanza's model for geographical location recognition. It achieved a precision of 0.58, a recall of 0.72 and an F-score of 0.64. These scores are higher than those of our own model (F-score of 0.39, precision of 0.44 and recall of 0.39), likely due to Stanza's model being trained on a significantly larger corpus. But they are only moderately good, largely due to differences in the training data. Stanza's model was trained on an annotated corpus that defines *geographical* entities slightly differently and includes document types that significantly differ from those in our corpus. As a result, some corpus-specific abbreviations, such as "MO" for *milk oligosaccharide*, were misclassified as false positives by Stanza, along with proper names like the names of the publication's authors. Additionally, Stanza's model frequently confused *geographical* entities with *breeds*, as certain breed names incorporate geographical locations (e.g., "Alaskan husky").

Compared to the rule-based approach, the machine-learning (ML) approach generally achieved higher recall and a better precision-recall balance, emphasizing its ability to

generalize and make predictions for unseen examples. The overall F-score for ML was also slightly higher (0.75 vs. 0.74). Performance varied across entity types, with the ML approach outperforming the rule-based method for most entities. However, the rule-based approach performed better for entities like *sample types* and *female physiological stages* that showed little variation and ambiguity. It also achieved higher performance for *lactation stages* and *oligosaccharide names*, although the F-scores of both methods were similar.

### Entity Normalization: Lexicon-based approach

Table 9 shows the performance of the lexicon-based approach for entity normalization. Performance is good for most entities, except for *geographical* entities. This is explained by the high ambiguity of *geographical* names (the same name may refer to different locations depending on the context) as already stated. *Oligosaccharide types*, *sample types* and *female physiological stages* obtained perfect scores due to the very small number of classes in the semantic references and the low variability of the entity forms.

Table 9: Entity normalization scores obtained by the lexicon-based approach.

Entity type / Semantic reference	Match accuracy
Species / NCBI	0.72
Methodology of analysis / MO methods thesaurus	0.96
Oligosaccharide name / MilkOligoThesaurus	0.62
Oligosaccharide type / Oligo type concepts	1.00
Geography / GeoNames	0.56
Sample type / Sample thesaurus	1.00
Female physiological stage / Female physiological stage thesaurus	1.00

### Entity Normalization: Machine-learning approach

We used the BioSyn ML approach to normalize entities related to *methodology of analysis*, *oligosaccharide names*, and *species*. In contrast, *oligosaccharide types*, *sample types* and *female physiological stages* are normalized with a very small number of concepts and show little ambiguity, so a simple rule-based approach is sufficient to obtain high performance, making more complex ML not necessary. For *geographical* locations, the semantic reference used for normalization (*GeoNames*) is so large that it becomes computationally prohibitive for BioSyn to handle, which is why we opted not to use it. Further investigation is needed to design a computationally efficient ML approach for this entity type, which we leave for future work.

The BioSyn ML results are shown in Table 10 as averages over 5 random initializations. Performance is rather good overall, and very consistent. For *species* entities, it is much higher than with the lexicon-based approach (0.85 vs. 0.72, respectively for BioSyn vs. the lexicon-based approach). It is slightly lower but still quite high (0.92 vs. 0.96) for *methodology of analysis* entities. The performance of both baselines is similar for *oligosaccharide names*.

Table 10: Entity normalization scores obtained by BioSyn (mean  $\pm$  standard deviation)

Entity type / Semantic reference	Match accuracy
Methodology of analysis / MO methods thesaurus	0.92 $\pm$ 0.0
Oligosaccharide name / MilkOligoThesaurus	0.62 $\pm$ 0.02
Species / NCBI	0.85 $\pm$ 0.0

## Binary relation extraction

Table 11 shows the scores for the relation extraction baseline in a 5-fold cross-validation setting. Performance is strong, near 70 F1-score and over, for most relation types given the complexity of the task. The relation *from* obtains slightly lower performance, which is probably due to the small number of its occurrences in the corpus. Only the *collected x days after parturition* relation gives very poor results. The model seems unable to learn this relation type. This may be due to its relatively low frequency of occurrences, as well as its strong dependence on context. This relation typically occurs only when the *species* entity is not mentioned nearby in the text and when the *has given birth since* relation between the *species* and the *postpartum age* cannot be annotated. Actually, the baseline method considers only entity pairs that appear together within a maximum of two sentences as candidates for a relation. As a result, entities that are farther apart are never predicted to be in relation with each other, leading to lower scores for most relation types. This limitation particularly affects the *composed of* and *analyzed by* relations, which have a higher proportion of long-distance relations (respectively 0.26 and 0.19).

It should also be noted that for some relations, especially the less frequent ones, the score is highly dependent on the split of the corpus, as indicated by higher standard deviations.

Table 11: Comparison of F-score, precision and recall across relation types.

Relation Type	F1-score	Precision	Recall
Analyzed by	0.63 $\pm$ 0.20	0.66 $\pm$ 0.21	0.64 $\pm$ 0.22
Collected at the stage	0.81 $\pm$ 0.12	0.89 $\pm$ 0.08	0.76 $\pm$ 0.19
Collected x days after parturition	0.19 $\pm$ 0.19	0.26 $\pm$ 0.35	0.35 $\pm$ 0.43
Composed of	0.58 $\pm$ 0.02	0.68 $\pm$ 0.08	0.51 $\pm$ 0.08
Found in quantity	0.73 $\pm$ 0.05	0.75 $\pm$ 0.09	0.73 $\pm$ 0.08

From	0.41 ± 0.40	0.42 ± 0.40	0.39 ± 0.40
Has a physiological stage	0.75 ± 0.42	0.71 ± 0.41	0.80 ± 0.45
Has given birth since	0.61 ± 0.20	0.67 ± 0.26	0.56 ± 0.16
Has produced	0.80 ± 0.03	0.84 ± 0.08	0.78 ± 0.07
Is a	0.78 ± 0.16	0.86 ± 0.19	0.76 ± 0.24
Number of	0.80 ± 0.29	0.83 ± 0.16	0.84 ± 0.36
Overall (Micro average)	0.68 ± 0.05	0.74 ± 0.05	0.64 ± 0.06

## Discussion

This paper presents the development of an annotation schema and the associated MilkOligoCorpus, a gold standard corpus, composed of 30 documents relevant to milk oligosaccharides composition in mammalian species. The annotation schema includes fourteen entity types, each of which is normalized, with a semantic resource, to standardize the information. Three databases, database from Remoroza et al. [20], MilkOligoDB [7], and Jin et al.'s database [8], dedicated to milk oligosaccharides are already available, offering an exhaustive overview of milk oligosaccharide composition in mammalian species. However, Remoroza et al.'s database [20] does not relate milk oligosaccharides to species while MilkOligoDB [7], and Jin et al.'s database [8] do not include metadata that are crucial to elucidate further hypotheses regarding parameters influencing milk oligosaccharides composition.

The originality of the MilkOligoCorpus relies on the richness of the annotated information. Notably, the characteristics of the experimentation (number of individuals, methodology of study, pooled milk or not), are crucial for further interpretation of the data, and detailed characteristics of females allow the development of further hypotheses.

The baseline methods we implemented and evaluated on our corpus yielded satisfactory performance overall for the three information extraction tasks despite their complexity. This demonstrates the usability of our corpus for the development of automatic methods to extract information about mammalian milk oligosaccharides. There is room for improvement in the performance, since we only tested common baselines and certain entity and relation types were more challenging. We plan to investigate these issues in future work with state-of-the-art methods, as well as the more complex task of n-ary relation extraction. We also hope that the release of our corpus and baselines will foster information extraction research in this domain.

For that purpose, the number of annotated articles may be a limitation of the MilkOligoCorpus. We have decided to put our efforts into the precision and richness of the annotation rather than into the quantity, specifically regarding the complexity of chemical

structure. We intend to extend this corpus with literature used to build existing databases [7] and [8].

Our final goal is to develop methods to retrieve information from the literature that we will make publicly available in a database including oligosaccharide molecules (different nomenclatures or ways of describing molecules co-exists in the scientific community, information with different levels of availability) and the relation between these molecules and phenotypic data, species mentions, stage of lactation, milk quality and maternal parameters from unstructured data. Automatic methods appear as a very promising way to alleviate the burden of the manual analysis of papers. The baseline methods we implemented give encouraging results, but need to be further improved in future work in order to achieve a good balance between automatic extraction and manual curation.

## Conclusion and future directions

Research in milk oligosaccharides has seen accelerated growth, making it challenging to maintain a detailed overview of the published literature. This work proposed an annotation schema designed to represent entities and relations modeling mammalian milk oligosaccharides and related information. It also addressed the creation of a gold-standard corpus intended for training and evaluation of NLP methods. Future work will involve the development of a database to host and facilitate access to and analysis of information about mammalian milk oligosaccharides from scientific articles. Based on experimental results, a workflow will also be developed to automate the extraction of relevant information from large volumes of articles. For that purpose, the annotation schema and gold-standard corpus will serve as a basis for the standardized representation, extraction, and storage of knowledge.

## Acknowledgments

We are grateful to the INRAE MIGALE bioinformatics facility (MIGALE, INRAE, 2020. Migale bioinformatics Facility, doi: 10.15454/1.5572390655343293E12) for providing computing resources. The authors thank Agnès Girard (INRAE) for her help in bibliographic search on PubMed.

## References

1. Walsh C, Lane J, van Sinderen D, Hickey R. Human milk oligosaccharides: Shaping the infant gut microbiota and supporting health. *Journal of Functional Foods*. 2020 Sep;72.
2. Ayechu-Muruzabal V, van Stigt A, Mank M, Willemsen L, Stahl B, Garssen J, et al. Diversity of Human Milk Oligosaccharides and Effects on Early Life Immune Development. *Frontiers in Pediatrics*. 2018 Sep 10;6.

3. Ruiz-Palacios GM, Cervantes LE, Ramos P, Chavez-Munguia B, Newburg DS. Campylobacter jejuni Binds Intestinal H(O) Antigen (Fuc $\alpha$ 1, 2Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc), and Fucosyloligosaccharides of Human Milk Inhibit Its Binding and Infection. *Journal of Biological Chemistry*. 2003 Apr;278(16):14112–20.
4. Coppa GV, Zampini L, Galeazzi T, Facinelli B, Ferrante L, Capretti R, et al. Human Milk Oligosaccharides Inhibit the Adhesion to Caco-2 Cells of Diarrheal Pathogens: Escherichia coli, Vibrio cholerae, and Salmonella fytis. *Pediatric Research*. 2006 Mar;59(3):377–82.
5. Eiwegger T, Stahl B, Haidl P, Schmitt J, Boehm G, Dehlink E, et al. Prebiotic oligosaccharides: In vitro evidence for gastrointestinal epithelial transfer and immunomodulatory properties. *Pediatric allergy and immunology*. 2010 Dec;21(8):1179–88.
6. Bode L, Jantscher-Krenn E. Structure-Function Relationships of Human Milk Oligosaccharides. *Advances in Nutrition*. 2012 May 1;3(3):383S-391S.
7. Durham SD, Wei Z, Lemay DG, Lange MC, Barile D. Creation of a milk oligosaccharide database, MilkOligoDB, reveals common structural motifs and extensive diversity across mammals. *Scientific Reports*. 2023 Jun 26;13(1):10345.
8. Jin C, Lundstrøm J, Korhonen E, Luis AS, Bojar D. Breast Milk Oligosaccharides Contain Immunomodulatory Glucuronic Acid and LacdiNAc. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2023 Sep;22(9):100635.
9. Urashima T, Messer M, Oftedal OT. Oligosaccharides in the Milk of Other Mammals. In: *Prebiotics and Probiotics in Human Milk*. Elsevier; 2017. p. 45–139.
10. Thurl S, Munzert M, Henker J, Boehm G, Muller-Werner B, Jelinek J, et al. Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. *British Journal of Nutrition*. 2010 Nov;104(9):1261–71.
11. Trevisi P, Luise D, Won S, Salcedo J, Bertocchi M, Barile D, et al. Variations in porcine colostrum oligosaccharide composition between breeds and in association with sow maternal performance. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2020 Mar 12;11(1).
12. Difilippo E, Willems HAM, Vendrig JC, Fink-Gremmels J, Gruppen H, Schols HA. Comparison of milk oligosaccharides pattern in colostrum of different horse breeds. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2015 May 20;63(19):4805–14.
13. Samuel TM, Binia A, de Castro CA, Thakkar SK, Billeaud C, Agosti M, et al. Impact of maternal characteristics on human milk oligosaccharide composition over the first 4 months of lactation in a cohort of healthy European mothers. *Scientific reports*. 2019 Aug 13;9(1):11767.
14. Plows JF, Berger PK, Jones RB, Alderete TL, Yonemitsu C, Najera JA, et al. Longitudinal Changes in Human Milk Oligosaccharides (HMOs) Over the Course of 24 Months of Lactation. *The Journal of nutrition*. 2021 Apr 8;151(4):876–82.

15. Seferovic MD, Mohammad M, Pace RM, Engevik M, Versalovic J, Bode L, et al. Maternal diet alters human milk oligosaccharide composition with implications for the milk metagenome. *Scientific reports*. 2020 Dec 16;10(1):22092.
16. Azad MB, Robertson B, Atakora F, Becker AB, Subbarao P, Moraes TJ, et al. Human Milk Oligosaccharide Concentrations Are Associated with Multiple Fixed and Modifiable Maternal Characteristics, Environmental Factors, and Feeding Practices. *The Journal of nutrition*. 2018 Nov 1;148(11):1733–42.
17. van Leeuwen SS. Challenges and Pitfalls in Human Milk Oligosaccharide Analysis. *Nutrients*. 2019 Nov 6;11(11):2684.
18. Gopal PK, Gill HS. Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *British Journal of Nutrition*. 2000 Nov;84(S1):69–74.
19. Difilippo E, Pan F, Logtenberg M, Willems R (H. AM, Braber S, Fink-Gremmels J, et al. Milk Oligosaccharide Variation in Sow Milk and Milk Oligosaccharide Fermentation in Piglet Intestine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016 Mar 16;64(10):2087–93.
20. Remoroza CA, Liang Y, Mak TD, Mirokhin Y, Sheetlin SL, Yang X, et al. Increasing the Coverage of a Mass Spectral Library of Milk Oligosaccharides Using a Hybrid-Search-Based Bootstrapping Method and Milks from a Wide Variety of Mammals. *Analytical Chemistry*. 2020 Aug 4;92(15):10316–26.
21. Krallinger M, Rabal O, Leitner F, Vazquez M, Salgado D, Lu Z, et al. The CHEMDNER corpus of chemicals and drugs and its annotation principles. *Journal of Cheminformatics*. 2015 Dec;7(S1):S2.
22. Bada M, Eckert M, Evans D, Garcia K, Shipley K, Sitnikov D, et al. Concept annotation in the CRAFT corpus. *BMC Bioinformatics*. 2012 Dec;13(1):161.
23. Kim JD, Ohta T, Tateisi Y, Tsujii J. GENIA corpus--semantically annotated corpus for biotextmining. *Bioinformatics*. 2003;19 Suppl 1:i180-182.
24. Kolarčik C, Klinger R, Friedrich CM, Hofmann-Apitius M, Fluck J. Chemical Names: Terminological Resources and Corpora Annotation. Workshop on Building and evaluating resources for biomedical text mining (6th edition of the Language Resources and Evaluation Conference) Vol 36 2008.
25. Luoma J, Nastou K, Ohta T, Toivonen H, Pafilis E, Jensen LJ, et al. S1000: a better taxonomic name corpus for biomedical information extraction. *Bioinformatics*. 2023 Jun 1;39(6):btad369.
26. Bossy R, Deléger L, Chaix E, Ba M, Nédellec C. Bacteria Biotope at BioNLP Open Shared Tasks 2019. In: Jin-Dong K, Claire N, Robert B, Louise D, editors. *Proceedings of the 5th Workshop on BioNLP Open Shared Tasks*. Hong Kong, China: Association for Computational Linguistics; 2019. p. 121–31.

27. Albrecht S, Lane JA, Mariño K, Al Busadah KA, Carrington SD, Hickey RM, et al. A comparative study of free oligosaccharides in the milk of domestic animals. *British Journal of Nutrition*. 2014 Apr 14;111(7):1313–28.
28. Macias Rostami S, Bénet T, Spears J, Reynolds A, Satyaraj E, Sprenger N, et al. Milk oligosaccharides over time of lactation from different dog breeds. *PLoS One*. 2014;9(6):e99824.
29. Salcedo J, Frese SA, Mills DA, Barile D. Characterization of porcine milk oligosaccharides during early lactation and their relation to the fecal microbiome. *Journal of dairy science*. 2016 Oct;99(10):7733–43.
30. Urashima T, Saito T, Nakamura T, Messer M. Oligosaccharides of milk and colostrum in non-human mammals. *Glycoconjugate Journal*. 2001 May;18(5):357–71.
31. Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI) [Internet]. [cited 2023 Jun 27]. Available from: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/>
32. Schoch CL, Ciuffo S, Domrachev M, Hottel CL, Kannan S, Khovanskaya R, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*. 2020 Jan 1;2020:baaa062.
33. GeoNames [Internet]. [cited 2024 Sep 10]. Available from: <http://www.geonames.org/>
34. LBO | Summary | AgroPortal [Internet]. [cited 2024 Sep 10]. Available from: <https://agroportal.lirmm.fr/ontologies/LBO>
35. Rumeau M, Fenaille F, Girard A, Loux V, Ba M, Nédellec C, et al. MilkOligoThesaurus, a dataset of mammalian milk oligosaccharide synonyms. *Data in Brief*. 2024 Jun;54:110404.
36. Cejuela JM, McQuilton P, Ponting L, Marygold SJ, Stefancsik R, Millburn GH, et al. tagtog: interactive and text-mining-assisted annotation of gene mentions in PLOS full-text articles. *Database*. 2014 Apr 7;2014(0):bau033–bau033.
37. Papazian F, Bossy R, Nédellec C. AlvisAE: a collaborative Web text annotation editor for knowledge acquisition. *Proceedings of the Sixth Linguistic Annotation Workshop 2012*.
38. Lee J, Yoon W, Kim S, Kim D, Kim S, So CH, et al. BioBERT: a pre-trained biomedical language representation model for biomedical text mining. *Bioinformatics*. 2020 Feb 15;36(4):1234–40.
39. Sung M, Jeon H, Lee J, Kang J. Biomedical Entity Representations with Synonym Marginalization. In: *Proceedings of the 58th Annual Meeting of the Association for Computational Linguistics*. Online: Association for Computational Linguistics; 2020. p. 3641–50.
40. Tizard IR. *Comparative mammalian immunology: the evolution and diversity of the immune systems of mammals*. Cambridge, MA: Academic Press; 2023.

41. Urashima T, Nakamura T, Yamaguchi K, Munakata J, Arai I, Saito T, et al. Chemical characterization of the oligosaccharides in milk of high Arctic harbour seal (*Phoca vitulina vitulina*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2003 Aug;135(4):549–63.
42. Tao N, Ochonicky KL, German JB, Donovan SM, Lebrilla CB. Structural Determination and Daily Variations of Porcine Milk Oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010 Apr 28;58(8):4653–9.
43. Xu G, Davis JC, Goonatileke E, Smilowitz JT, German JB, Lebrilla CB. Absolute Quantitation of Human Milk Oligosaccharides Reveals Phenotypic Variations during Lactation. *The Journal of Nutrition*. 2017 Jan;147(1):117–24.

## Chapitre 2 Analyse de la capacité des bactéries commensales intestinales de porcelets et lapereaux à dégrader les oligosaccharides du lait selon leur structure

---

La deuxième étape de cette thèse visait à étudier la fonctionnalité des oligosaccharides du lait *in vitro*. Elle se décline en deux volets complémentaires. Le premier, présenté dans ce chapitre, explore les interactions directes entre MOs et bactéries intestinales, afin de déterminer si les MOs modulent le microbiote intestinal de nos espèces d'intérêt, porcs et lapins, et si cette modulation dépend de la structure des MOs. Pour cela, des bactéries ont été isolées à partir de fèces de porcelets et de contenu caecal de lapereaux à l'aide de méthodes de culture anaérobie, permettant d'obtenir une collection représentative de la diversité microbienne des deux espèces. Au total, 240 isolats ont été obtenus et identifiés par séquençage de l'acide désoxyribonucléique ribosomique (ADNr) 16S.

Neuf souches sélectionnées sur la base de leur affiliation et de leur composition en GH selon la base CAZy, ont été cultivées en présence de trois MOs appartenant aux principales familles structurales (neutre, fucosylé et acide), afin d'évaluer leur capacité à les dégrader. Les analyses ont porté sur la croissance bactérienne, la consommation des MOs et les produits de la dégradation des MOs. Par ailleurs, le génome complet de huit de ces neuf souches a été séquencé, dans le but d'identifier les gènes potentiellement impliqués dans la dégradation des MOs. Ces séquençages nous ont également permis de déterminer plus finement l'affiliation des espèces bactériennes étudiées.

Ces résultats font l'objet de l'article 3. Les informations supplémentaires volumineuses sont accessibles via des documents annexes transmis dans un lien séparé. Elles incluent la liste détaillée des isolats obtenus (Table S3), les concentrations en AGCCs (Table S5) ainsi que la concentration des métabolites détectés dans les surnageants après culture avec les MOs (Table S6).

### **Article 3 : Dégradation structure-dépendante des oligosaccharides du lait par des souches bactériennes commensales intestinales nouvellement isolées de porcelets et de lapereaux allaités**

#### **Article en révision à BMC microbiology**

Rumeau M., Chadi S., Pepke F., Beaumont M., Vicente C., Juppeau A., Vandecasteele C., Cauquil L., Pascal G., Langella P., Knudsen C., Combes S. et Martín R.

Mots clés : Oligosaccharides du lait ; microbiote intestinal ; *Bacteroides* ; glycoside hydrolase ; séquençage du génome entier ; acides gras à chaîne courte ; acide gras à chaîne ramifiée

#### Résumé :

**Contexte** : Les oligosaccharides du lait de mammifères sont les premiers prébiotiques naturels pour les nouveau-nés, favorisant le développement d'un microbiote intestinal bénéfique. La capacité des bactéries à utiliser ces sucres complexes dépend de leur structure, mais les données se limitent aux bactéries isolées chez les nouveau-nés humains. Cette étude vise à examiner *in vitro* les relations fonctionnelles entre la variabilité structurale des oligosaccharides du lait et les capacités métaboliques de nouvelles bactéries commensales intestinales isolées chez des lapereaux et porcelets allaités.

**Résultats** : Un total de 240 souches bactériennes intestinales anaérobies ont été isolées à partir de porcelets et de lapereaux allaités, et 9 souches ont été cultivées en présence d'oligosaccharides du lait structurellement différents : lacto-N-tetraose, 2'-fucosyllactose, 3'-sialyllactose ou 6'-sialyllactose. Cinq souches, appartenant à *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides* sp. D2, *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA et *Phocaeicola vulgatus*, ont été capables d'utiliser les oligosaccharides du lait. Les courbes de croissance ont révélé que le glucose favorisait une croissance plus rapide, mais conduisait à une biomasse finale plus faible que les oligosaccharides du lait. Le taux de croissance et la biomasse bactérienne finale variaient en fonction de la structure de l'oligosaccharide du lait, la biomasse finale étant plus élevée avec le 2'-fucosyllactose. Les taux de consommation des oligosaccharides du lait dépassaient 40 % pour tous les oligosaccharides chez les souches *B. fragilis*, *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA et *P. vulgatus*. Inversement, les souches *B. thetaiotaomicron* avec 6'-sialyllactose et *Bacteroides* sp. D2 pour chaque oligosaccharide du lait, ont affiché un taux de consommation inférieur à 40 %. La fermentation des oligosaccharides du lait a généré un métabolome plus diversifié que celle du glucose. L'utilisation des oligosaccharides du lait a augmenté la production de propionate, d'isobutyrate, d'isovalerate, de 2-méthylbutyrate et de 1,2-propanediol. Fait remarquable, la fermentation du 2'-fucosyllactose a entraîné une production substantielle de 1,2-propanediol. Le séquençage du génome entier des souches

bactériennes a révélé la présence de diverses glycosides hydrolases dans le génome des souches capables de dégrader les oligosaccharides du lait.

**Conclusions :** Cette étude démontre la capacité de diverses bactéries commensales intestinales de lapereaux et de porcelets allaités à fermenter différentes structures d'oligosaccharides du lait, révélant des profils de métabolisation spécifiques à l'espèce bactérienne et dépendants de la structure de l'oligosaccharide en question. Ces résultats mettent en évidence l'application potentielle des oligosaccharides du lait en tant que suppléments prébiotiques pour soutenir la santé intestinale des animaux d'élevage.

## Structure-dependent degradation of milk oligosaccharides by newly isolated intestinal commensal bacterial strains from suckling piglets and rabbits

Mathilde Rumeau<sup>1,2</sup>, Sead Chadi<sup>2</sup>, Frederic Pepke<sup>2</sup>, Martin Beaumont<sup>1</sup>, Cláudia M. Vicente<sup>1</sup>, Agathe Juppeau<sup>1</sup>, Céline Vandecasteele<sup>3</sup>, Laurent Cauquil<sup>1</sup>, Géraldine Pascal<sup>1</sup>, Philippe Langella<sup>2</sup>, Christelle Knudsen<sup>1</sup>, Sylvie Combes<sup>1\*</sup> and Rebeca Martín<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, 31326 Castanet-Tolosan, France ;

<sup>2</sup> Micalis Institute, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

<sup>3</sup> GeT-PlaGe, Genotoul INRAE, 31326 Castanet-Tolosan, France

\*Corresponding author: [rebeca.martin-rosique@inrae.fr](mailto:rebeca.martin-rosique@inrae.fr), [sylvie.combes@inrae.fr](mailto:sylvie.combes@inrae.fr)

**Background:** Mammalian milk oligosaccharides serve as the first natural prebiotics for newborns, promoting the development of a beneficial gut microbiota. The ability of bacteria to use these complex sugars depends on their structure, but data are limited to bacteria isolated from newborn humans. This study aims to investigate *in vitro* the functional relationship between the structural variability of milk oligosaccharides and the metabolic capacities of newly intestinal commensal bacteria isolated from suckling rabbits and piglets.

**Results:** A total of 240 anaerobic intestinal bacterial strains were isolated from suckling piglets and rabbits, and 9 strains were cultivated in the presence of structurally different milk oligosaccharides: lacto-N-tetraose, 2'-fucosyllactose, and 3'-sialyllactose or 6'-sialyllactose. Five strains, belonging to *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides* sp. D2, *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA and *Phocaeicola vulgatus* were able to utilize milk oligosaccharides. Growth curves revealed that glucose supported faster growth, while, leading to a lower final biomass compared to milk oligosaccharides. Both the growth rate and the final bacterial biomass varied depending on the milk oligosaccharide structure, with higher final biomass reached with 2'-fucosyllactose. The consumption rates of milk oligosaccharides exceeded 40% for all oligosaccharides in *B. fragilis*, *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA and *P. vulgatus* strains. Conversely, *B. thetaiotaomicron* with 6'-sialyllactose and *Bacteroides* sp. D2 strains for each milk oligosaccharide displayed a consumption rate below 40%. Milk oligosaccharide fermentation generated a more diverse metabolome compared to glucose. Utilization of milk oligosaccharides increased the production of propionate, isobutyrate, isovalerate, 2-methylbutyrate and 1,2-propanediol. Remarkably, fermentation of 2'-fucosyllactose resulted in substantial 1,2-propanediol production. Whole genome sequencing of the bacterial strains revealed the presence of diverse glycoside hydrolase in the strains capable of metabolizing milk oligosaccharides.

**Conclusions:** This study demonstrates the capacity of diverse intestinal commensal bacteria from suckling rabbits and piglets to ferment diverse milk oligosaccharide structures, revealing species-specific and milk oligosaccharide structure-dependent metabolization profiles. These

findings highlight the potential application of milk oligosaccharides as prebiotic supplements to support gut health in farm animals.

Keywords: Milk oligosaccharides, gut microbiota, *Bacteroides*, glycoside hydrolase, whole genome sequencing, short chain fatty acids, branched chain fatty acids

## Background

Milk serves as the primary and sole source of nutrition for mammalian neonates until they can transition to solid food [1]. Lactation is specifically tailored to meet the nutritional and physiological needs of young mammals [2]. Beside nutritional components, milk contains non-nutritional bioactive compounds, such as immunoglobulins, enzymes, antimicrobial peptides, hormones, cytokines and growth factors, which positively influence host physiology and shape the infant's gut microbiota [3]. Significant attention has been paid to milk oligosaccharides (MOs), the third most abundant component in human milk after lactose and lipids [4]. MOs do not provide nutritional value to the host due to the inability of digestive enzyme to degrade them [5]. Instead, the majority reaches the large intestine intact, where they exert several functions, including the protection against pathogens, the strengthening of the gastrointestinal barrier and the modulation of the immune response [6,7]. Additionally, MOs are considered as prebiotics, fermentable ingredients selectively used by host gut microbiota resulting in beneficial effects for the host [8]. These molecules are conserved across mammalian species, although variations in their amounts and diversity of structural features have been described [9].

MOs are composed of six monosaccharides residues, glucose (Glc), galactose (Gal), N-acetylglucosamine (GlcNAc), fucose (Fuc), N-acetylneuraminic acid (NeuAc) and N-glycolylneuraminic acid (NeuGc), this last being only present in non-human mammalian milk [10,11]. The vast majority of MOs begin with the disaccharide lactose at the reducing end (Gal $\beta$ 1-4Glc), which is linked via  $\beta$ 1-3 or  $\beta$ 1-6 to a disaccharide formed by Gal and GlcNAc. Based on the linkage between these two residues, we distinguish two motifs, lacto-N-biose (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc) and N-acetyllactosamine (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) [12]. These motifs can be repeated several times linked via  $\beta$ 1-3 or  $\beta$ 1-6 [11]. This core can further be elongated by adding one or more Fuc residues linked in  $\alpha$ 1-2-,  $\alpha$ 1-3- or  $\alpha$ 1-4- and/or one or more NeuAc and/or NeuGc linked in  $\alpha$ 2-3- or  $\alpha$ 2-6- [12].

Based on the monosaccharide linkage, different glycoside hydrolases (GHs) are required for MO degradation. Consequently, the ability of a bacteria to consume MOs depend on its GH profiles according to the MO structure [13]. The bacterial fermentation of the MOs results in the production of metabolites such as short chain fatty acids (SCFAs), branched chain fatty acids (BCFAs), amino-acid related and nucleic acid-related metabolites [14–16]. These metabolites can shape the gut microbial composition, provide energy to the host cells,

enhance the intestinal mucosal barrier and modulate the immune response [17–21]. However, it is still unclear which specific MOs support the growth of individual bacteria. Most studies use bacteria grown on a mixture of MOs, making it difficult to assess the effects of a specific MOs, although variations in bacterial consumption profiles based on MO structure have been observed by studying single MOs [22,23]. For instance, in humans, *Bifidobacterium* species, which play a crucial role in the gut of human neonates, have received considerable attention due to their strong ability to utilize human MOs (HMOs) [24–29]. However, these bacteria are less prevalent in the gut microbiome of other young mammalian species such as pigs and rabbits [30,31], and several studies indicated that the utilization of MOs is not exclusive to *Bifidobacteria* members [32,33].

This study aims to explore *in vitro* the functional relationships between MOs structural diversity and the metabolic capacities of newly isolated commensal bacteria using feces samples of newborn piglets and cecal content samples of newborn rabbits, two species that often encounter digestive disorders around weaning [34,35]. Effectively managing microbial colonization in these animals in early life is crucial for improving their health [36].

## Materials and methods

### *Sample collection*

Fresh fecal samples were collected from three 28 days-old healthy Piétrain x (Large White x Landrace) suckling piglets directly from the rectum into anaerobic devices (GutAlive, MicroViable therapeutics; Spain) at INRAE experimental facilities (UE1421 UEPR, Saint-Gilles, France; Agreement No. D35-275-32). The breeding rooms were environmentally controlled to keep the ambient temperature around 24°C. The piglets stayed with their biological mother until weaning (28 days of age). Three 16-23 days-old healthy suckling rabbits were killed by electronarcosis followed by an exsanguination at the INRAE PECTOUL experimental facility (GenPhySE, Castanet-Tolosan, France) (<https://doi.org/10.17180/ftvh-x393>). Caeca were carefully dissected, and their content transferred to anaerobic devices (GutAlive, MicroViable therapeutics). The animals were raised in our INRAE experimental facilities ; for pigs : UE1421 UEPR, Saint-Gilles, France; Agreement No. D35-275-32, <https://doi.org/10.15454/1.5573932732039927E12>, for rabbit: the INRAE PECTOUL experimental facility (GenPhySE, Castanet-Tolosan, France) <https://doi.org/10.17180/ftvh-x393>). Suckling rabbits were raised with their doe in wire cages with a nest box under control ambient temperature around 24°C. All animal handling was conducted in accordance with the current ethical standards of the European Community (Directive 2010/63/EU), and the French legislation on animal experimentation and ethics. The experiment received the approval of the local ethics committee: Ethical committee in animal experimentation (CEEA) "Science et santé animales CEEA-115" and "Comité Rennais d’Ethique en matière d’Expérimentation Animal CEEA-007" for rabbits and pigs respectively. The approval is registered under the

numbers SSA\_2021\_001 and APAFIS #35552-2022022312418292 v3 for rabbits and pigs, respectively). Details about the sampled individuals, including genetics, sex, age, and body weight are provided in Table S1. All samples were shipped at room temperature and received within 48 h after collection at Commensals and Probiotics-Host Interactions Laboratory (MICALIS Institute INRAE, Jouy-en-Josas, France) where they were stored at 4°C until processed 24h later. Samples were introduced in an anaerobic chamber ( $N_2 = 90\%$ ,  $CO_2 = 5\%$  and  $H_2 = 5\%$ ), weighted, resuspended in physiological serum with 16% glycerol (final concentration) and stored at -80°C.

### Culture media and bacterial isolation

Bacterial isolation was performed in an anaerobic chamber with controlled atmosphere ( $N_2 = 90\%$ ,  $CO_2 = 5\%$  and  $H_2 = 5\%$ ) (Figure 1). To capture the diversity, three rich culture media were used: Brain heart infusion supplemented with 5 mg/L of hemin (BHIS) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, United States); Gifu Anaerobic Medium (GAM) (Himedia, Modautal, Germany); Reinforced Clostridial medium (RCM) (Merck, Darmstadt, Germany) and three selective culture media: *Bacteroides* bile esculin agar (BBE) (Sigma-Aldrich), selective for the isolation of *Bacteroides*; Laked Brucella Blood Agar supplemented with 10 mg.mL<sup>-1</sup> of K1 vitamin, 7.5 mg/L of vancomycin, 100 mg/L of kanamycin and 5 mg/L of hemin (LKV) (Sigma-Aldrich), selective for gram negative *Bacilli*; Man Rogosa and Sharpe (MRS) (Sigma-Aldrich), selective for the isolation of *Lactobacillaceae*. When required, agar (15%, Difco; Franklin Lakes, New Jersey, United States) was added to the media. To reduce the presence of oxygen all the media were supplemented with 0.5 g/L of L-cysteine and introduced in the anaerobic chamber at least 48 h before the experiments.

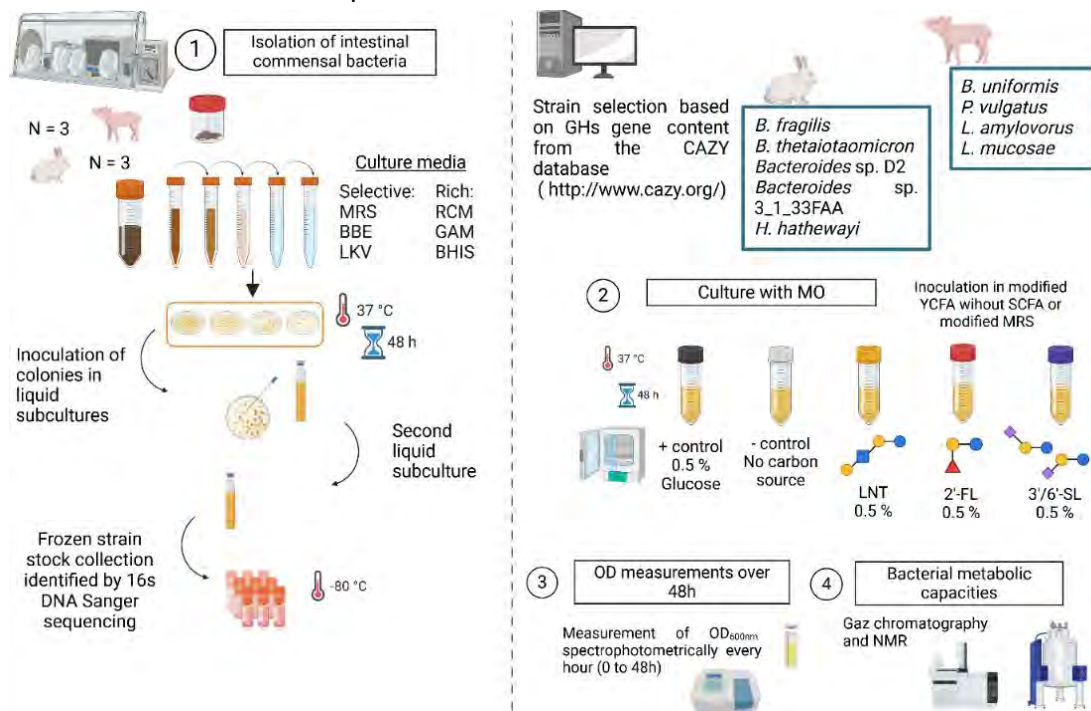


Figure 1: Experimental design for (1) the isolation of intestinal commensal bacteria and the selection of isolates for, (2) the culture of isolated bacteria with MOs, (3) the growth and (4) metabolome analysis after bacterial growth with MOs.

Samples were homogenized and diluted in physiological serum at a concentration of 100 mg of sample /mL. 100 µL of dilutions  $10^{-3}$  to  $10^{-6}$  were plated. After 48 h of incubation at 37°C, to maximize variability while minimizing multiple isolations of the same strain, approximately 10 colonies per plate were selected, variable in shape, color and size based on visual observations. Each colony was handpicked and transferred to tubes containing 5 mL of corresponding liquid media and incubated at 37°C. After 24h of incubation, 100 µL were inoculated in 4 mL of corresponding liquid media and incubated for another 24h at 37°C. Then, 1 mL of 80 % glycerol was added onto the tubes to reach a final concentration of 16% and stored at -80°C. The remaining bacteria in liquid media were removed from the anaerobic chamber for bacterial identification (Figure 1).

#### *Enrichment procedure*

For rabbit samples, to reduce the presence of *Enterobacteriaceae* and capture the bacterial diversity, culture media for the isolation procedure were supplemented with antibiotics and enrichment methods were also performed. The culture media supplemented were: MRS supplemented with 10 µg/mL of colistin (MRSc); GAM supplemented with 10 µg/mL of colistin (GAMc); BHIS supplemented with 10 µg/mL of colistin and 2 µg/mL of gentamycin (BHISc); LKV; MRS supplemented with 10 µg/mL of colistin and 8 µg/mL of vancomycin (MRS1); MRS supplemented with 4 µg/mL of ampicillin, 10 µg/mL of colistin and 8 µg/mL of vancomycin (MRS2); RCM supplemented with 10 µg/mL of colistin and 8 µg/mL of vancomycin (RCMc). For enrichment methods, 50 µL of frozen rabbit cecal content were incubated for 48 h at 37°C in 5 mL of four different selective broth culture media. Following enrichment, the isolation procedure was performed as described above.

#### *Identification of bacteria using 16S ribosomal gene sequencing*

The remaining liquid culture were centrifuged 15 minutes at 5 000 g to obtain a bacterial pellet. PCR amplification of 16S rDNA from the pellets was performed in a 25 µL final volume containing 0.2 µM primers, 200 µM dNTP and 0.125 µL of dreamTaq enzyme (Dream Taq polymerase; ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States). The amplification program included one cycle at 95°C for 15 min, followed by 38 cycles composed of 30 s at 98°C, followed by annealing at 52°C for 30 s, and extension at 72°C for 1.5 min. A final extension step at 72°C for 10 min completed the reaction. Primers used for whole 16S rRNA gene amplification are listed in Table S2.

After amplification, PCR products were checked using 1% agarose gel. If no amplification was observed, Precellys lysis (3 600 rpm during 30 seconds three times) was performed on PBS resuspended bacterial pellets with ceramic beads (0-0.25 mm). After a final 5 minutes centrifugation at 8 000g, 2 µL of supernatant were used for the amplification as described earlier. Amplification products were sequenced by Eurofins (Nantes, France) with the Sanger

sequencing method. The 16S rDNA sequencing results, aligned on the software BioEdit [37], of approximately 1 000 nucleotides were compared using the EzBiocloud 16S based ID blast tool (version 20210707) for taxonomic assignment of colonies [38].

### Milk oligosaccharides

Four commercially available MOs representative of the three types of MOs, *i.e.*, lacto-N-tetraose (LNT), 2'-fucosyllactose (2'-FL), 3'-sialyllactose (3'-SL) and 6'-sialyllactose (6'-SL) were supplied by Inbiose (Zwijnaarde, Belgium) (Figure 1) with purity greater than 90%. The acidic type is represented by two molecules based on the first results of milk oligosaccharide composition in pigs and rabbits, 3'-SL prevailing in pig milk while 6'-SL prevails in rabbits' [39].

### Selection of isolates to grow with MOs

Isolates to grow with the MOs were selected based on the predicted presence of the GH required to hydrolyze the glycosidic linkages of the different MO (Table S3, Figure 2). The CAZy database [40] was queried using 16S taxonomic affiliations. The enzymes required for the hydrolysis of LNT are classified in the families GH20, GH112 and GH136, the enzymes required for the hydrolysis of 2'-FL are classified in the family GH95 and the enzymes required for the hydrolysis of 3'-SL and 6'-SL are classified in the GH33 family. The enzymes required for the hydrolysis of the remaining lactose, which is shared by the four MOs, are classified in the families GH1, GH2, GH35 and GH42 families [41,42].

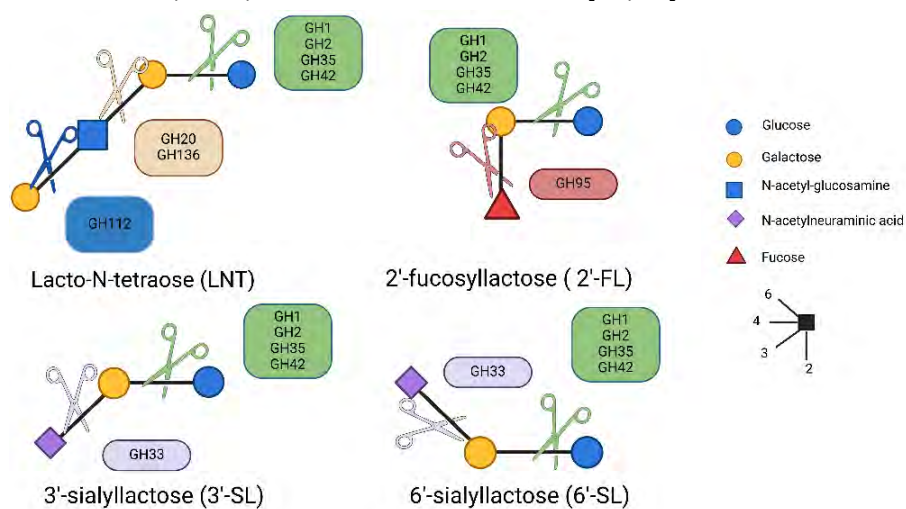


Figure 2: Schematic representation of the structure of neutral (lacto-N-tetraose = LNT), fucosylated (2'-fucosyllactose = 2'-FL) and sialylated (3'-sialyllactose = 3'-SL or 6'-sialyllactose = 6'-SL) MOs along with glycoside hydrolases (GHs) families possibly involved in their hydrolysis. Monosaccharides and linkage representation follow the nomenclature of the Symbol Nomenclature For Glycans (SNFG) [43]. The schema was generated with Biorender.

### Capacity of bacteria to degrade MOs

Prior to growth with MOs, bacterial isolates were reconstituted from frozen stocks by preculturing for four days in the appropriate growth media. All experimental steps were

carried out in an anaerobic chamber as described above. Frozen stock cultures of the five selected isolates (Isolate\_71: *Bacteroides fragilis*, Isolate\_128: *Bacteroides thetaiotaomicron*, Isolate\_130: *Bacteroides* sp. D2, Isolate\_55: *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA and Isolate\_30: *Hungatella hathewayi*) from suckling rabbit caecum and two isolates (Isolate\_182: *Bacteroides uniformis* and Isolate\_180: *Phocaeicola vulgatus*) from piglet fecal samples were plated on BHIS agar plates supplemented with 0.5 mg.mL<sup>-1</sup> cysteine, 1 mg.mL<sup>-1</sup> maltose, 1 mg.mL<sup>-1</sup> cellobiose and incubated for 48h at 37°C. Frozen stock cultures of two isolates (Isolate\_183: *Lactobacillus amylovorus* and Isolate\_190: *Limosilactobacillus mucosae*) from piglet fecal samples were plated on MRS supplemented with 0.5 mg.mL<sup>-1</sup> cysteine and incubated for 48h at 37°C. Next, colonies were then inoculated in 5 mL of corresponding broth media at 37°C. After 24h, 100 µL were inoculated in 10 mL of the corresponding broth media and grown for an additional 24h at 37 °C.

After growth, bacteria were centrifuged and the pellets were washed twice in 2 mL of phosphate-buffered saline (PBS). OD<sub>600nm</sub> of the resulting bacterial suspension in PBS was measured. Two semi-defined media were used for cultivation with MOs, depending on the strain: modified Yeast extract casitone and fatty acid broth (mYCFA) medium [44] lacking SCFAs for *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *Bacteroides* sp. D2, *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA, *H. hathewayi*, *B. uniformis* and *P. vulgatus* strains; modified MRS (mMRS) medium [45] for *L. amylovorus* and *L. mucosae* strains. Modified YCFA was prepared, and pH adjusted to 5.90 before autoclaving to obtain a final pH of 6.5. Semi-defined media, mYCFA and mMRS, were supplemented with 0.5% (5 mg.mL<sup>-1</sup>) of LNT, 2'-FL, 3'-SL or 6'-SL as the sole carbon source for growth and inoculated with a volume of the bacterial preculture corresponding to 0.1 OD in a final volume of 15 mL as timepoint 0 and incubated anaerobically at 37°C for 48h. Media containing 0.5% glucose served as a positive control while media without any carbohydrate source for growth served as a negative control. Bacterial biomass was assessed spectrophotometrically by measuring optical density at 600 nm (OD<sub>600nm</sub>) throughout fermentation (0 to 72h). The spectrophotometer was blanked with the semi-defined media without bacteria (Figure 1). Regular plating on Petri dishes with the media used for preculturing (BHIS or MRS) was made to ensure the absence of contamination. Experiments were performed in duplicates or triplicates. During the stationary phase of each bacterial growth, 1.5 mL of liquid culture was collected and centrifuged at 12 000g at 4°C for 15 min outside of the anaerobic chamber. Supernatants were recovered and stored at -80°C until analysis (Figure 1).

#### *Short and branched chain fatty acids analysis*

Concentrations of SCFAs and BCFAs were determined using a gas chromatograph (GC; Agilent 6890 N Network; Santa Clara, California, United States). Frozen supernatants were thawed and deproteinized overnight at 4°C with the addition of phosphotungstic acid (10% (v/v); Sigma-Aldrich). Samples were then centrifuged for 15 min at 12 000g at 4°C and 40 µL of

supernatant was added in a 2 mL vial with 10  $\mu$ L of 2ethyl butyrate (2-ethylbutyric acid, 99%; Sigma-Aldrich) to a final concentration of 20 mM as internal standard.

Two technical replicates were used for each biological replicate. Data were processed using the OpenLab ChemStation software (Agilent) and expressed in mM. Concentrations of SCFA in media before inoculation (timepoint 0) were subtracted from concentrations in samples. Samples with concentrations below quantification limits (0.1 mM for acetate; 0.05 mM for propionate; 0.03 mM for iso butyrate and butyrate; 0.025 mM for isovalerate and valerate) were replaced by the value of their respective quantification limit. Results were expressed as foldchanges relative to the concentration of each metabolite in the culture medium of the same strain cultured with glucose.

#### *<sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis*

Bacterial supernatants were thawed and centrifuged twice (18 000g, 4°C, 10 min). The resulting supernatants (50  $\mu$ L) were transferred in 600  $\mu$ L <sup>1</sup>H-NMR buffer (prepared in D<sub>2</sub>O, pH 7, TSP 1 mM) and vortexed. Then, 600  $\mu$ L of the mix were transferred to a 5 mm <sup>1</sup>H-NMR tube. Samples were analyzed with an Avance III HD NMR spectrometer operating at 600.13 MHz for 1H resonance frequency using a 5 mm inverse detection CryoProbe (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) in the MetaToul-Axiom metabolomics platform (INRAE, Toulouse, France). After baseline correction and water region (4.5-5.1 ppm) exclusion, spectra (0.5-9 ppm) were bucketed (0.01 ppm bucket width) and normalized by the total area with the R package ASICS [46]. For metabolite identification, spectra of pure compounds prepared in the same buffer and acquired with the same spectrometer were overlaid with sample spectra using Topspin. For each identified metabolite, a bucket nonoverlapping with other metabolites was selected for the quantification as indicated in Table S4. Results were expressed as foldchanges relative to the concentration of each metabolite in the culture medium of the same strain cultured with glucose.

#### *DNA extraction and whole genome sequencing*

Frozen stock cultures of the five selected isolated strains (*B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *Bacteroides* sp. D2, *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA and *H. hathewayi*) from suckling rabbit caecum and three isolated strains (*P. vulgatus*, *L. amylovorus* and *L. mucosae*) from piglet fecal samples were grown anaerobically. A 50 mL aliquot of the enriched culture was prepared and genomic DNA was isolated and purified using the Genomic-tip 100/G kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer instructions. DNA extraction was unsuccessful for *B. uniformis* because of technical issues and was not included in the whole genome sequencing. The concentration and purity of the DNA was determined by measuring the absorbance at 230, 260 and 280 nm using a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop-8000; ThermoFisher Scientific). The length of the purified DNA fragments was measured with a Femto® Pulse system (Agilent) electropherogram. Genome sequencing was performed at the GeT-PlaGe

genomic platform (Toulouse, France) using the HiFi Single molecule real-time (SMRT®) PacBio HiFi sequencing.

### *Genome annotation*

The raw reads were *de novo* assembled using SMRTLink [47]. Assembly qualities were evaluated with BUSCO [48]. The average nucleotide identity (ANI) and Tetra-nucleotide correlation were calculated using JSpecies and used to affiliate the strain according to their genome [49]. The identification of CAZymes across the genomes was carried out using dbCAN3 [50]. The assembled contigs were annotated into CAZy families and sub-families. Annotations were considered only if they matched with at least two of the three tools. Sequences are available at European Nucleotide Archive (ENA) repository under the reference PRJEB86776.

### *Data analysis*

All data analyses were performed using R software (v-4.3.2). Growth measurements were analyzed using the Growthcurver package, which also includes parameters interpretations used for the calculation of generation time [51]. A Principal component analysis (PCA) was performed on the <sup>1</sup>H-NMR metabolites relative concentration using the mixOmics package [52]. Data from all strains were pooled and statistical analysis were performed using the Kruskal-Wallis test, followed by *post-hoc* pairwise comparisons with Dunn's test, to assess differences between types of MOs, neutral (LNT), fucosylated (2'-FL) and sialylated (3'-SL or 6'-SL). Within isolates (n = 2 or 3 biological replicates) analysis is exclusively descriptive.

## Results

### *Isolation of gut commensal bacterial strains*

To investigate the functional relationships between MOs structural diversity and metabolic capacities of intestinal commensal bacteria, we isolated gut commensal bacterial strains from suckling rabbits and piglets. We targeted bacterial species belonging to dominant families from suckling piglets (*Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminocacaceae* and *Lactobacillaceae*) and suckling rabbits (*Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae*) [31,53] using three rich and three selective media. After analysis of their 16S DNA sequence, a collection of 240 unique bacterial isolates was constituted, 148 from suckling rabbit caeca and 92 from suckling piglet feces (Table S3). In both host species, the isolated strains belonged to three phyla, *Bacillota*, formerly *Firmicutes* (49% in pigs and 16% in rabbits), *Pseudomonadota*, formerly *Proteobacteria* (39% in pigs and 36% in rabbits) and *Bacteroidota* (12% in pigs and 48% in rabbits). Most of the strains isolated from piglet feces belonged to *Enterobacteriaceae* (37% of isolated strains), followed by *Lactobacillaceae* (16%) and *Streptococcaceae* (11%). Strains isolated from the rabbit caecum mainly belonged to

*Bacteroidaceae* (48%), followed by *Enterobacteriaceae* (36%) and *Enterococcaceae* (13%) (Figure 3). At genus level, in pigs, *Bacteroides* were less prevalent, covering solely 3% of total isolates, *Escherichia* (37%) and *Streptococcus* (15%) being dominant. The addition of strains from the genera *Lactobacillus*, *Ligilactobacillus* and *Limosilactobacillus*, members of the former genus *Lactobacillus*, represent 16% of the isolates (Figure 3). In rabbits, 42% of strains isolated from rabbits belonged to *Bacteroides*, notably to *NQMG\_s* KFT8, an unclassified *Bacteroides* first isolated in human feces and also known as *Bacteroides* sp KFT8, with 32 isolates out of 148. In total, 26 strains isolated from suckling pig feces represented 14 genera from 12 different families while 17 strains isolated from suckling rabbit caecum were spread across 9 genera from 5 families.

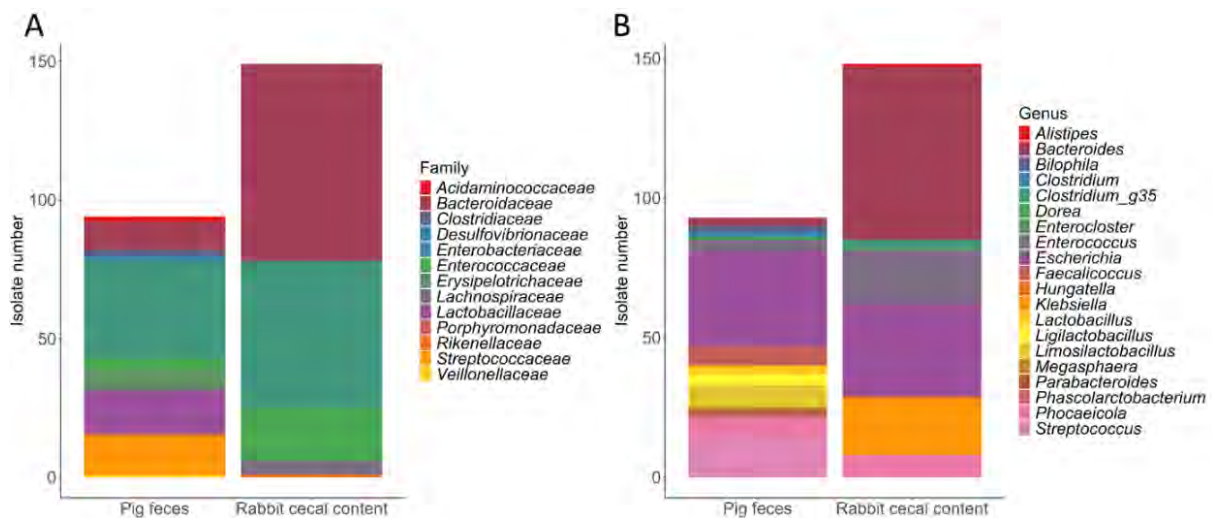


Figure 3: Composition of the collection of bacteria isolated from suckling rabbit caecum and suckling piglet feces at (A) the family level, and at (B) the genus level with data represented as absolute number of isolated strains. Affiliation results are based on the 16S rDNA sequences using Sanger sequencing using EzBiocloud with a minimum of 92 % similarity.

In the unmodified media bacterial isolation, the majority (69%) of the isolates in rabbits belonged to the *Enterobacteriaceae* family and were identified in all media, except LKV (Table S3). Adding colistin in MRS, GAM and BHIS media suppressed the growth of *Enterobacteriaceae*, however, *Enterococcaceae*, that were minimal in the first two isolations (3% of isolates), were numerous in these three colistin supplemented media (21%). The enrichment and the supplementation of the media MRS and RCM with antibiotics – colistin, vancomycin, ampicillin – resulted in 33 isolates of *Bacteroidaceae* and one *Rikenellaceae* (Table S3).

#### Strain growth is dependent on MO structure

Following our investigation of the CAZy database based on 16S taxonomic affiliation, one strain of each species which possess a repertoire of the previously described GHs capable of breaking the bounds found in LNT, 2'-FL, 3'-SL or 6'-SL was selected: *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *Bacteroides* sp. D2 (*NQMG\_s* based on 16S), *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA (*P. dorei* based on 16S), *H. hathewayi*, *B. uniformis*, *P. vulgatus*, *L. amylovorus* and *L. mucosae*.

We decided to select *Lactobacillaceae* even though they do not possess many GHs because they are recognized as probiotic strains [54,55]. To gain more insight into how specific MOs influence the growth of relevant commensal intestinal species, we examined the effects of four MOs representative of the three structural groups, lacto-N-tetraose (LNT), 2'-fucosyllactose (2'-FL), and 3'-sialyllactose or 6'-sialyllactose (3'-SL or 6'-SL for piglet and rabbit isolates respectively). Growth assays were carried out by inoculation in semi-defined media supplemented with 0.5% of each single MO as the only carbon source. Growth pattern with glucose supplemented media was used as reference. Semi-defined media without an added carbon source was used to confirm the inability of our strains to grow solely with the media components. All the selected strains grew with glucose. However, *H. hathewayi*, *B. uniformis*, *L. mucosae* and *L. amylovorus* strains did not grow with any of the MOs, regardless of their structure. In contrast, *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *Bacteroides* sp. D2, *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA and *P. vulgatus* strains exhibited a species-specific notable growth with MOs (Figure 4).

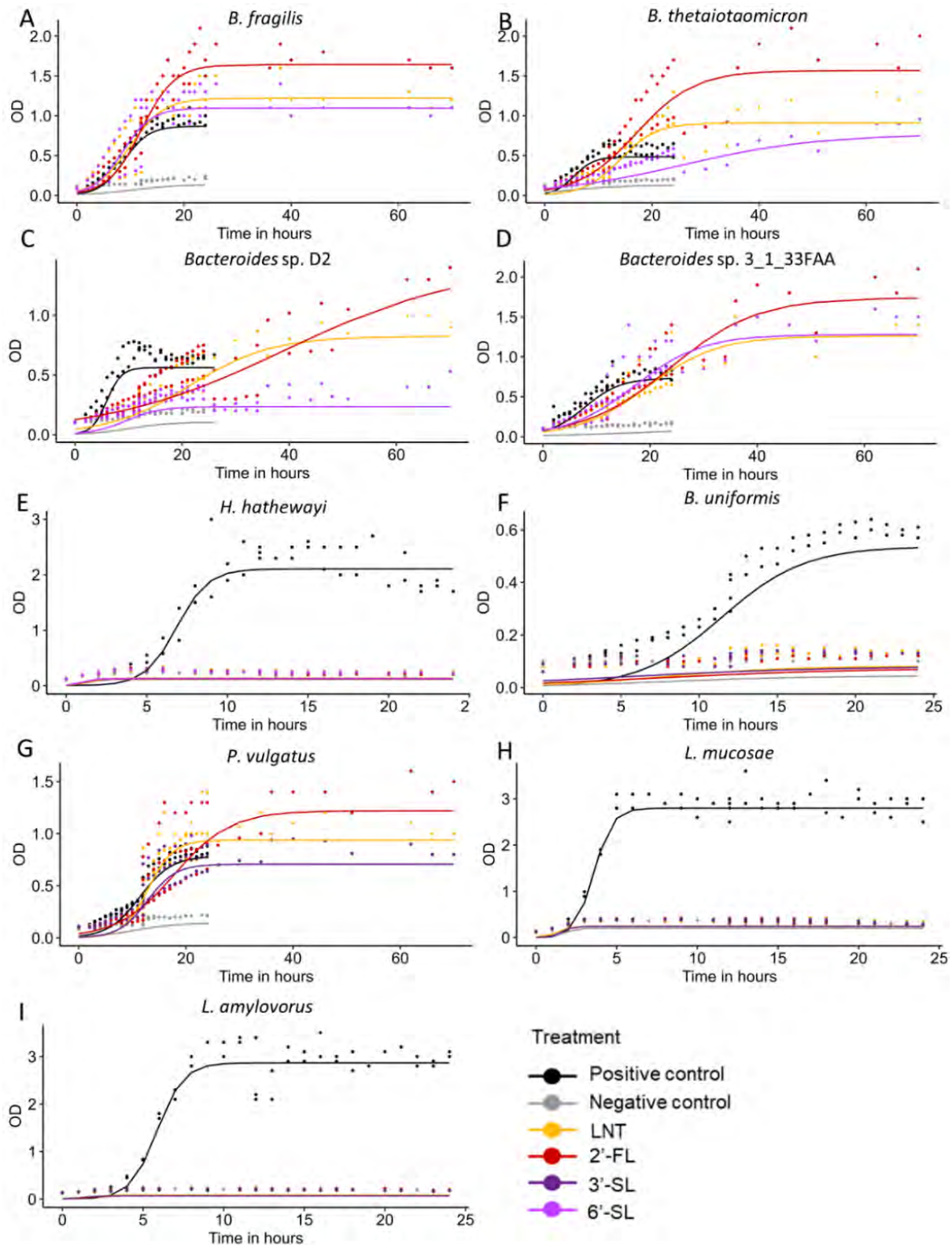


Figure 4: Growth curves of (A) *B. fragilis* (B) *B. thetaiotaomicron* (C) *Bacteroides* sp. D2 (D) *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA (E) *H. hathewayi* (F) *B. uniformis* (G) *P. vulgatus* (H) *L. mucosae*, and (I) *L. amylovorus* grown in semi-defined media, mYCFa or mMRS, alone (negative control) or supplemented with either 0.5% glucose (positive control), lacto-N-tetraose (LNT), 2'-fucosyllactose (2'-FL), 3'-sialyllactose (3'-SL) or 6'-sialyllactose (6'-SL). Growth was measured spectrophotometrically over a 72-h period by measuring optical density at a wavelength of 600 nm (OD<sub>600nm</sub>). Curves were generated using the Growthcurver package. Dots represent OD<sub>600nm</sub> as measured for each replicate (n = 2 or 3 per isolate and carbon source), lines represent the predicted values from the logistic regression model. Values are expressed as optical density (OD<sub>600nm</sub>) subtracted by the blank (OD<sub>600nm</sub> in the medium alone).

Among the strains that grew with MOs, *B. thetaiotaomicron*, *Bacteroides* sp. D2, *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA and *P. vulgatus* strains grew faster when cultivated with glucose compared to MOs, reaching the stationary phase between 15 and 20 h. In contrast, *B. fragilis* reached the stationary phase around 17 h after cultivation for both glucose and MOs. The generation times were shorter with glucose than with MOs, except for *P. vulgatus* when grown with LNT and 3'-SL (Table 1). *B. fragilis* had the shortest generation time with 6'-SL, (0.3 h shorter compared to other MOs). *B. thetaiotaomicron* had the shortest generation time with LNT, 40% shorter than with 2'-FL and 75% shorter than with 6'-SL (Table 1). *Bacteroides* sp. D2 strain showed the shortest generation time with 6'-SL and a 5-time longer generation time with 2'-FL, LNT displaying intermediate values (Table 1). Both *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA and *P. vulgatus* strains showed the highest generation time with 2'-FL, 30% longer for *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA compared to LNT and 6'-SL and 114% longer for *P. vulgatus* compared to LNT and 3'-SL (Table 1). Although growth was overall fastest with glucose, in most cases the highest OD<sub>600nm</sub> was reached with MOs (Figure 4). *B. fragilis* strain achieved 35 (6'-SL) to 84% (2'-FL) higher maximum OD<sub>600nm</sub> with all three MOs compared to glucose. *B. thetaiotaomicron* strain displayed 61% to 118% greater maximum growth with 2'-FL compared to LNT and 6'-SL that was only moderately superior to that of glucose (Table 1). Similarly, *Bacteroides* sp. D2 showed delayed degradation with 2'-FL but reached a 40% higher maximal OD<sub>600nm</sub> compared to LNT. The bacterial biomass of *Bacteroides* sp. D2 with 6'-SL remained low with a maximal OD<sub>600nm</sub> of 0.53, and did not surpass that of glucose (Table 1). *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA demonstrated 88% (6'-SL and LNT) to 147% greater maximum OD<sub>600nm</sub> with all three MOs compared to glucose. As observed for the other isolates growing with MOs, although slower, the growth with 2'-FL reached a 30% higher maximal biomass compared to LNT and 6'-SL. *P. vulgatus* showed strong growth with LNT and 2'-FL, 26% and 57% higher compared to 3'-SL that induced moderate growth similar to that with glucose (Table 1).

Table 1: Metrics associated with the growth curves of the bacteria in semi-defined media, mYCFa or mMRS, supplemented with 0.5% glucose, lacto-N-Tetraose (LNT), 2'-fucosyllactose (2'-FL), 3'-sialyllactose (3'-SL) or 6'-sialyllactose (6'-SL). Growth was measured spectrophotometrically over a 72-h period by measuring optical density at a wavelength of 600 nm (OD<sub>600nm</sub>). Data are presented as mean values (n = 2 or 3).

Isolate	Group	Generation time (Hours)	Max OD <sub>600nm</sub>
<i>Bacteroides fragilis</i> (Isolate_71)	Glucose	1.58	1.03
	LNT	2.22	1.60
	2'-FL	2.15	1.90
	6'-SL	1.86	1.40
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (Isolate_128)	Glucose	1.27	0.65
	LNT	2.32	1.30
	2'-FL	3.78	2.10
	6'-SL	8.68	0.96
<i>Bacteroides</i> sp. D2 (Isolate_130)	Glucose	0.93	0.75
	LNT	5.26	1.00
	2'-FL	11.7	1.40
	6'-SL	2.24	0.53
<i>Bacteroides</i> sp. 3_1_33FAA (Isolate_55)	Glucose	2.33	0.85
	LNT	4.48	1.60
	2'-FL	5.55	2.10
	6'-SL	4.37	1.60
<i>Hungatella hathewayi</i> (Isolate_30)	Glucose	0.68	2.70
	LNT	0.35	0.32
	2'-FL	0.26	0.30
	6'-SL	0.27	0.30
<i>Bacteroides uniformis</i> (Isolate_180)	Glucose	1.82	0.62
	LNT	2.82	0.14
	2'-FL	4.39	0.13
	3'-SL	4.56	0.14
<i>Phocaeicola vulgatus</i> (Isolate_183)	Glucose	2.06	0.85
	LNT	1.62	1.20
	2'-FL	3.65	1.50
	3'-SL	1.82	0.95
<i>Limosilactobacillus mucosae</i> (Isolate_190)	Glucose	0.40	3.10
	LNT	0.30	0.39
	2'-FL	0.19	0.40
	3'-SL	0.18	0.40
<i>Lactobacillus amylovorus</i> (Isolate_183)	Glucose	0.57	3.40
	LNT	0.50	0.23
	2'-FL	0.45	0.22
	3'-SL	0.35	0.22

In conclusion, although glucose supported faster growth in most cases, the highest biomass production was generally achieved with MOs, particularly 2'-FL. However, there were notable intra-species variations in growth patterns, indicating a structure-dependent preference for certain MOs (Figure 4).

*Consumption of milk oligosaccharides and accumulation of milk oligosaccharides monosaccharide monomers differ based on the MOs structure*

At the end of the culture, the percentage of MOs consumed was calculated (Figure 5) and the quantities of the MO monomers accumulated in the medium during growth were measured in order to assess whether the bacteria were able to hydrolyze glycosidic links and release monosaccharides (Figure 6). For all five strains able to degrade MOs, growth resulted in a decrease in the amount of the available MOs, with species-specific consumption patterns observed (Figure 5). *B. fragilis* strain was efficient at consuming LNT with 61% of the molecules consumed, while only 48% and 41% of 2'-FL and 6'-SL, respectively, were consumed. *B. thetaiotaomicron* strain had the highest consumption for 2'-FL (54%) and consumed 43% of LNT. However, this species was less efficient at consuming 6'-SL with only 19% consumed which is in accordance with growth curves observations. *Bacteroides* sp. D2 was the least efficient in the consumption of all three MOs compared to the other strains, consuming 24% of LNT, 17% of 2'-FL and 5% of 6'-SL. *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA was particularly efficient in the consumption of 2'-FL and 6'-SL with 63% and 79%, respectively while consumption of LNT was 57%. *P. vulgatus* consumed all MOs, between 45% and 55% (Figure 5).

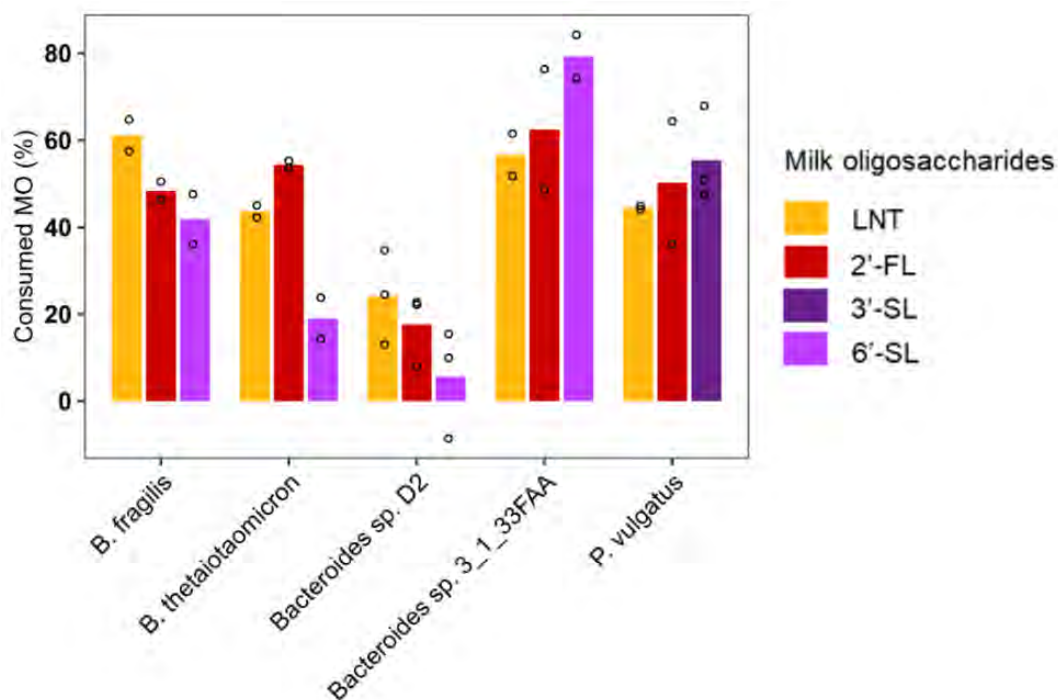


Figure 5: Consumption of substrate after growth in semi-defined media (mYCFA) supplemented with 0.5% lacto-N-tetraose (LNT), 2'-fucosyllactose (2'-FL), 3'-sialyllactose (3'-SL) or 6'-sialyllactose (6'-SL). The concentration was measured by nuclear magnetic resonance during the stationary phase. Data are presented as the relative amount of substrate remaining respectively to the uninoculated medium: YCFA with LNT, 2'-FL, 3'-SL or 6'-SL. Histograms represent mean values and dots represent values of each replicate (n = 2 or 3).

The consumption of MOs can lead to the accumulation of several monosaccharide constituents (Figure 6). The quantity of GlcNAc, a constituent of the LNT, was not released in the medium with concentrations systematically below those measured in the uninoculated YCFA medium supplemented with LNT. In contrast, the consumption of 2'-FL resulted in the release of a Fuc for *B. thetaiotaomicron*, *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA and *P. vulgatus* strains with concentrations 58, 103 and 142-fold-higher than in the uninoculated YCFA medium supplemented with 2'-FL, respectively. For all five strains, NeuAc accumulated in the culture media from the 3'-SL or 6'-SL degradations. This accumulation was however weaker in the supernatants of *Bacteroides* sp. D2 (2-fold-higher), consistent with its low consumption of 6'-SL. *B. fragilis* and *B. thetaiotaomicron* strains released a similar amount of NeuAc, 6-fold-higher than in the uninoculated medium even though percentage of consumption was higher for *B. fragilis* (Figure 6). *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA and *P. vulgatus*, the most efficient at consuming acidic MOs in our experiment, had the highest concentration of NeuAc, from 12-fold-higher for *P. vulgatus* to 21-fold-higher for *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA. Irrespective of the milk oligosaccharide's structure, glucose did not accumulate in the supernatant of *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* and *Bacteroides* sp. D2 strains with fold change values below 1 (Figure 6). For galactose, both *B. fragilis* and *B. thetaiotaomicron* displayed concentrations 1 to 2-fold higher when grown with LNT or 2'-FL while the concentration was lower than in the uninoculated medium for 6'-SL. Higher quantities of galactose were detected in the supernatant of *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA compared to the media alone with 18-fold higher levels for 2'-FL, 12-fold higher for LNT and 9-fold-higher for 6'-SL. Similarly, concentrations of galactose found within *P. vulgatus* cultures after consumption of 2'-FL, LNT and 3'-SL were 13, 5 and 7-fold higher compared to the uninoculated media respectively (Figure 6).

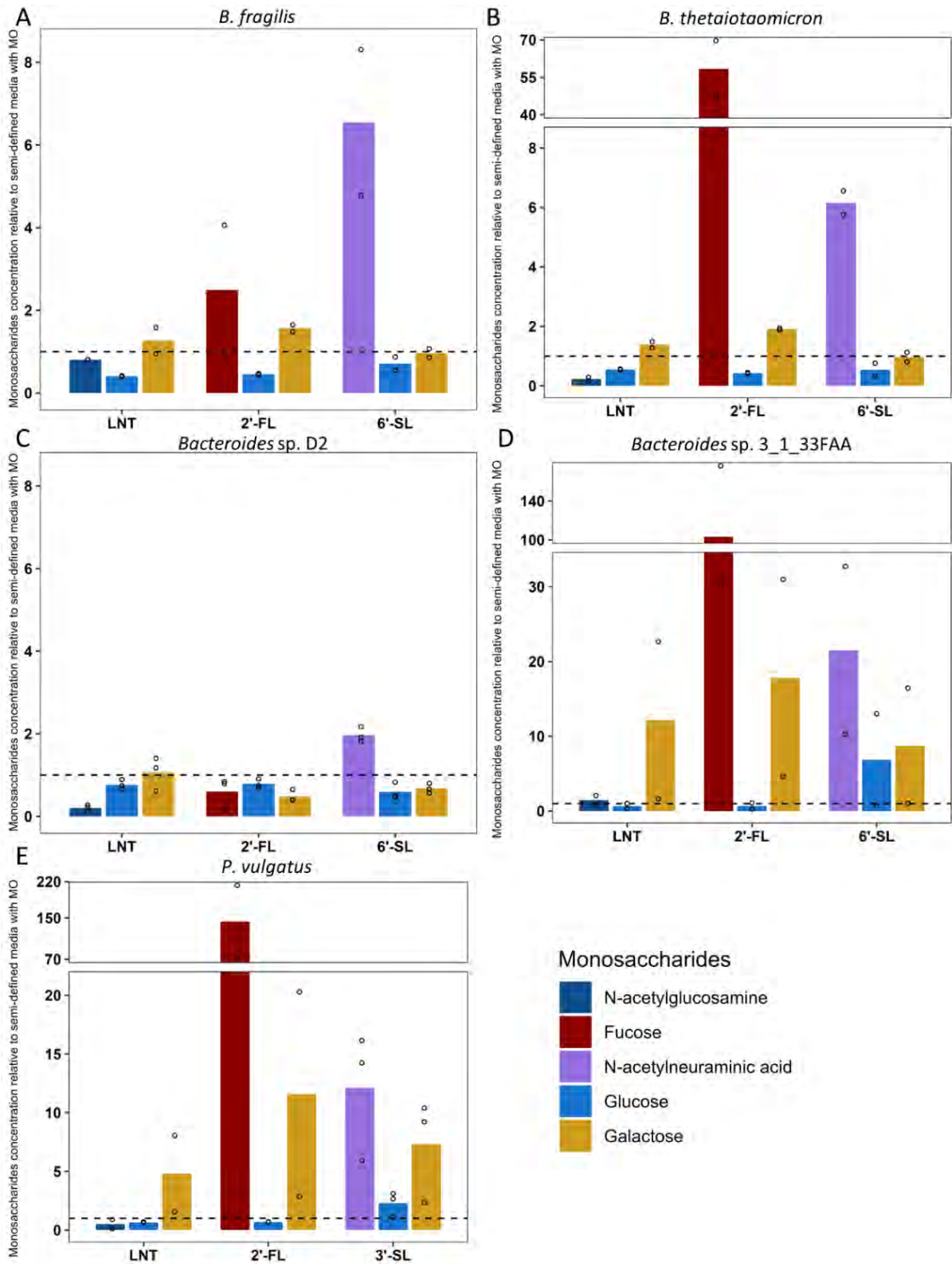


Figure 6: Accumulation of the monosaccharide constituents after growth in semi-defined media (mYCFAs) supplemented with 0.5% lacto-N-tetraose (LNT), 2'-fucosyllactose (2'-FL), 3'-sialyllactose (3'-SL) or 6'-sialyllactose (6'-SL) of (A) *B. fragilis* (B) *B. thetaiotaomicron* (C) *Bacteroides sp. D2* (D) *Bacteroides sp. 3\_1\_33FAA* (E) *P. vulgatus*. Data are presented as the relative amount of monosaccharide remaining respectively to the uninoculated medium: YCFA with LNT, 2'-FL, 3'-SL or 6'-SL. Barplots represent mean values and dots represent values of each replicate (n = 2 or 3).

### *Patterns of SCFA and BCFA production depend on the structure of MOs*

We determined the SCFAs and BCFAs (acetate, propionate, butyrate, isobutyrate, isovalerate, valerate, isocaproate and caproate) production by the nine selected strains at the stationary phase during fermentation of LNT, 2'-FL, 3'-SL or 6'-SL, glucose or without supplemented carbon source. Valerate, caproate and isocaproate were undetectable in all the analyzed bacterial supernatants. All the isolates in culture with glucose as carbon source (positive control) produced mainly acetate (Supplementary Figure 1, Table S5). In line with the inability of *H. hathewayi*, *B. uniformis*, *L. mucosae* and *L. amylovorus* strains to grow with MOs, only minor amounts of acetate were detected when cultured with MOs (< 3.91 mM) while the other SCFAs and BCFAs were not detected in supernatants (Table S5). Regarding the strains able to grow with MOs, *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *Bacteroides* sp. D2, *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA and *P. vulgatus* strains displayed a more diverse pattern of SCFAs and BCFAs production when grown with MOs, compared to glucose, with detectable production of acetate, propionate, isobutyrate and isovalerate. Acetate and propionate were the major SCFA products from MOs fermentation while the BCFAs isobutyrate and isovalerate were quantified at lower levels (below 1 mM) (Supplementary Figure 1 and Table S5).

SCFA and BCFA concentrations in bacterial cultures with MOs were expressed relatively to the concentrations in the positive control *i.e.*, with glucose, to appreciate the differences between MOs fermentation compared to a common carbon source (Figure 7 and Supplementary Figure 2). All bacteria growing with MOs produced propionate, isovalerate and isobutyrate, with concentrations ranging from similar to those observed with glucose to up to 10-fold higher, depending on the MOs and the bacteria. Interestingly, 2'-FL strongly stimulated the production of isobutyrate for all bacteria, with levels 3 to 6-fold higher than with glucose, while this induction was much more moderate or not observed with neutral (LNT) and sialylated (3'-SL or 6'-SL) oligosaccharides, with fold changes relative to glucose between 1 and 3 (Figure 7). Taking into account the five strains growing with MOs, statistical analyses using the Kruskal-Wallis test revealed a significant difference between MOs (p-milk oligosaccharides < 0.05) for the production of isobutyrate (Table 2). *Post-hoc* analyses indicated significantly higher isobutyrate concentrations with 2'-FL than with LNT or 3'-SL or 6'-SL (p < 0.05) while no significant differences was detected between LNT and 3'-SL or 6'-SL. MOs degradation shows different patterns between the species. Fermentation of 2'-FL by *Bacteroides* sp. D2 strain produced higher amounts of isovalerate (6-fold higher vs 4-fold higher with LNT and 6'-SL) and propionate (5-fold higher vs 3-fold higher with LNT and 6'-SL) compared to LNT and 6'-SL (Figure 7). While *P. vulgatus* strain produced less SCFAs and BCFAs compared to the other species, regardless of the MO structures, with a maximum of 3-fold higher production compared to glucose.

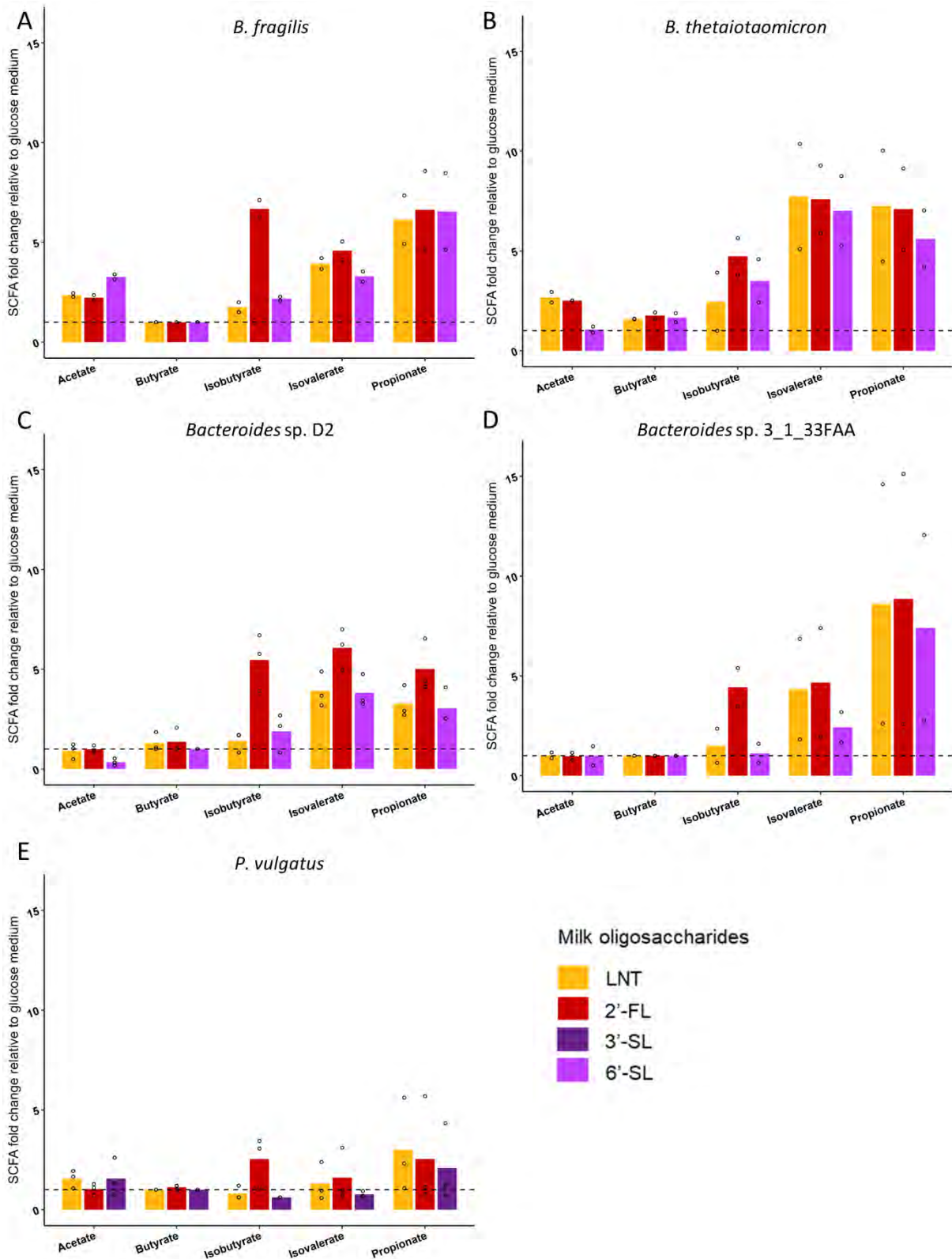


Figure 7: In vitro short chain fatty acids and branched chain fatty acids production by (A) *B. fragilis* (B) *B. thetaiotaomicron* (C) *Bacteroides sp. D2* (D) *Bacteroides sp. 3\_1\_33FAA* (E) *P. vulgatus* cultivated in semi-defined media (mYCFa or mMRS) supplemented with 0.5% lacto-N-tetraose (LNT), 2'-fucosyllactose (2'-FL), 3'-sialyllactose (3'-SL) or 6'-sialyllactose (6'-SL). The concentrations were measured during the stationary phase. Values were calculated by subtracting the values from semi-defined media without bacterial strains. Data are expressed relative to the concentrations measured in the positive control (glucose). Barplots represent mean values and dots indicate values of each replicate (n = 2 or 3).

Table 2: Metabolites production between types of MOs regardless of the isolated strains. P-value was determined with the Kruskal-Wallis test, followed by post-hoc pairwise comparison with Dunn's test. For metabolites with p-value < 0.05, letters indicate mean significant differences between types of MOs.

	Neutral (LNT) n = 12	Fucosylated (2'-FL) n = 12	Sialylated (3'-SL or 6'-SL) n = 12	Kruskal-Wallis p-value
	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE	
GC-MS				
Acetate	1.63 ± 0.76	1.46 ± 0.7	1.36 ± 1.1	0.649
Butyrate	1.17 ± 0.31	1.25 ± 0.39	1.11 ± 0.27	0.411
Isobutyrate	1.51 ± 0.95 <sup>a</sup>	4.64 ± 1.78 <sup>b</sup>	1.76 ± 1.2 <sup>a</sup>	<0.001
Isovalerate	3.97 ± 2.69	4.72 ± 2.66	3.26 ± 2.29	0.258
Propionate	4.81 ± 4.06	5.42 ± 4.02	4.21 ± 3.45	0.518
NMR metabolites				
2-methylbutyrate	7.62 ± 3.39	8.61 ± 3.91	5.75 ± 2.84	0.138
Ethanol	1.46 ± 0.45 <sup>a</sup>	0.49 ± 0.17 <sup>b</sup>	1.13 ± 0.13 <sup>a</sup>	<0.001
Formate	2.22 ± 2.08	1.15 ± 0.5	1.23 ± 0.27	0.561
Fumarate	1.76 ± 2.41	1.62 ± 1.92	1.21 ± 1.11	0.577
Lactate	0.79 ± 0.52	0.68 ± 0.41	0.84 ± 0.72	0.928
Malic acid	2.75 ± 1.86	1.93 ± 1.8	2.4 ± 2.05	0.336
1,2-propanediol	2.24 ± 0.56 <sup>a</sup>	41.47 ± 21.96 <sup>b</sup>	1.83 ± 0.38 <sup>a</sup>	<0.001
Succinate	2.09 ± 1.36	1.64 ± 1.16	1.44 ± 0.99	0.367
Alanine	1.09 ± 0.16	1.08 ± 0.18	1.01 ± 0.21	0.603
Asparagine	1.32 ± 0.22	1.15 ± 0.15	1.18 ± 0.25	0.143
Aspartate	1.96 ± 2.88	1.94 ± 2.76	1.64 ± 1.97	0.996
Betaine	0.54 ± 0.07	0.49 ± 0.04	0.51 ± 0.05	0.414
Glutamate	1.72 ± 0.57	1.74 ± 0.47	1.44 ± 0.39	0.180
Glycine	1.39 ± 0.23	1.4 ± 0.12	1.63 ± 0.4	0.480
Isoleucine	1.06 ± 0.14	1.01 ± 0.19	0.98 ± 0.19	0.423
Leucine	1.02 ± 0.1	0.92 ± 0.11	0.99 ± 0.13	0.068
Lysine	1.08 ± 0.15	1.03 ± 0.11	1.01 ± 0.16	0.478
Methionine	1.36 ± 0.33	1.23 ± 0.25	1.26 ± 0.26	0.598
Phenylalanine	1.08 ± 0.09	0.99 ± 0.09	1.03 ± 0.12	0.109
Proline	2.3 ± 0.65	2.21 ± 0.58	1.78 ± 0.44	0.103
Pyroglutamate	1.11 ± 0.09	1 ± 0.09	1.04 ± 0.09	0.024
Tryptophane	1.01 ± 0.13	0.9 ± 0.15	0.99 ± 0.2	0.175
Tyrosine	1.17 ± 0.21	1.09 ± 0.19	1.08 ± 0.22	0.589
Valine	1.46 ± 0.21	1.36 ± 0.18	1.31 ± 0.19	0.260

### Metabolization of MOs resulted in a structure-dependent metabolome

We explored how MOs impacted the metabolic activity of the isolated bacteria able to grow with these carbohydrates by analyzing supernatant metabolome for metabolites other than SCFAs with NMR-based metabolomics. Supernatants generated during growth of *B. fragilis*, *B.*

*thetaitaomicron*, *Bacteroides* sp. D2, *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA and *P. vulgatus* strains on LNT, 2'-FL, 3'-SL or 6'-SL or glucose allowed the identification of 36 different metabolites (Table S4). As observed for BCFA and SCFA, NMR-based metabolomes from supernatants of bacteria cultivated with MOs present a higher diversity than those cultivated with glucose (Table S6 and Supplementary Figure 3).

In order to identify the metabolites whose production was the most associated with the structure of MOs, we performed a principal component analysis (PCA) on the species able to grow with MOs (Supplementary Figure 4). The first two principal components of the PCA (Supplementary Figure 4 A) accounted for 24 and 19% of the total variance and showed that the metabolome with MOs is distinguished from the control condition (glucose) according to the second component. Along the second component, metabolome from the glucose condition were characterized by a higher concentration in glucose, betaine and lactate (Supplementary Figure 4 B). No clustering according to the MO was observed.

Metabolite concentrations were expressed relative to the concentration of metabolites measured in the positive control *i.e.*, bacteria grown with glucose, to appreciate the differences in MOs metabolization compared to a common carbon source (Figure 8 and Figure 9). Among BCFAs, 2-methylbutyrate, was markedly increased with MOs compared to glucose. Concentration in *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* and *Bacteroides* sp. D2 were 9 to 11-fold higher compared to glucose when grown with 2'-FL and LNT, and 6 to 9-fold higher with 6'-SL, while this increase was more moderate for *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA with 7, 5, and 2-fold higher concentrations compared to glucose with 2'-FL, LNT and 3'-SL, respectively. This increase was even lower with *P. vulgatus* strain where it averaged 3-fold higher compared to glucose regardless of the MO (Figure 8). Betaine concentration was decreased with MOs compared to glucose in all strains, and in particular *Bacteroides* sp. D2 had a betaine concentration 2.2-fold lower compared to glucose for 2'-FL and 6'-SL and it was 2.2 lower for *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA in 6'-SL. Ethanol production was always lower compared to glucose when cultivating with 2'-FL regardless of the bacteria (fold change ranging from 0.3 to 0.6). Statistical analyses using the Kruskal-Wallis test revealed a significant difference between the different milk oligosaccharides used for growth ( $p$ -milk oligosaccharides < 0.05) in ethanol production (Table 2). *Post-hoc* analyses indicated significantly lower ethanol production with 2'-FL compared to LNT or 3'-SL or 6'-SL ( $p$  < 0.05), while no significant differences were detected between LNT and 3'-SL or 6'-SL. LNT degradation by *Bacteroides* sp. D2 induced 4-fold higher formate levels compared to glucose while it was not increased with 6'-SL and 2'-FL. Fumarate concentrations were increased for all MOs compared to glucose (3 to 5-fold higher) in *B. fragilis*. Fermentation of 6'-SL by *B. thetaiotaomicron* and *Bacteroides* sp. D2 strains resulted in fumarate concentration 2 and 2.5-fold lower compared to glucose, respectively. Concentrations of malic acid in supernatants of *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA grown with MOs were lower than with glucose (fold change ranging from 0.5 to 0.7), while they were 5-fold higher with all three MOs in *P. vulgatus* (Figure 8). Succinate was produced

in highest concentration in *B. fragilis* culture compared to the other bacteria (4.5-fold higher in LNT while 3.8 and 3-fold higher in 2'-FL and 6'-SL compared to glucose, respectively) (Figure 8). Interestingly, 2'-FL greatly increased the relative concentration of the metabolite 1,2-propanediol, also known as propylene glycol, a precursor of propionate. The concentration of this metabolite increased more than 50-fold in *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, and *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA strains, and 25-fold in *Bacteroides* sp. D2 and *P. vulgatus* after cultivation with 2'-FL while it was solely between 1.4 to 2.5-fold-higher with LNT and 3'-SL or 6'-SL (Figure 8). Concentration of 1,2-propanediol was significantly higher with 2'-FL compared to LNT ( $p < 0.05$ ) as well as 3'-SL or 6'-SL ( $p < 0.05$ ) while no significant differences was detected between LNT and 3'-SL or 6'-SL (Table 2).

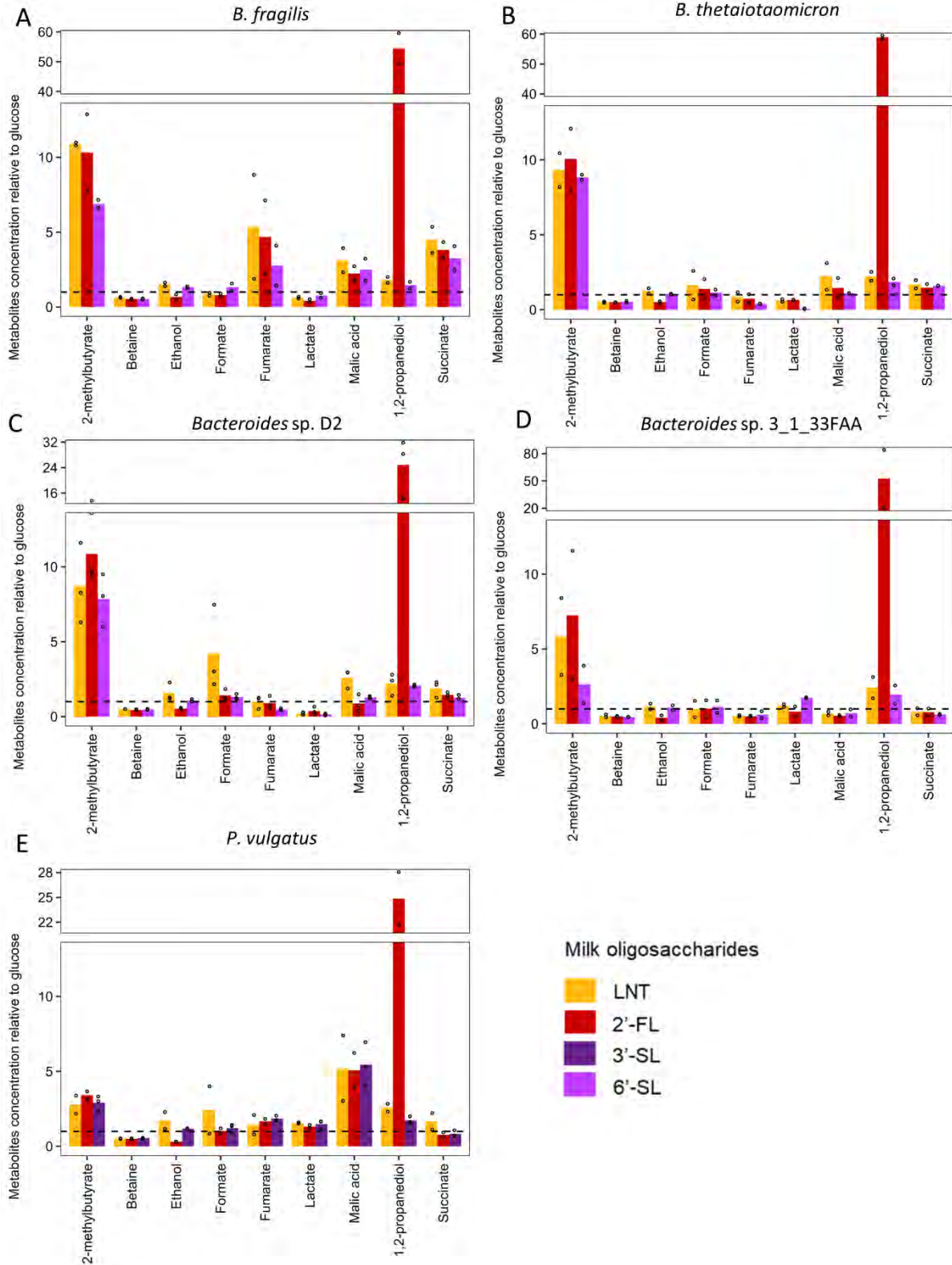


Figure 8: Relative concentration of bacterial metabolites after growth in semi-defined media (mYCFa) supplemented with either 0.5% lacto-N-tetraose (LNT), 2'-fucosyllactose (2'-FL), 3'-sialyllactose (3'-SL) or 6'-sialyllactose (6'-SL) of (A) *B. fragilis* (B) *B. thetaiotaomicron* (C) *Bacteroides* sp. D2 (D) *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA (E) *P. vulgatus*. Data are expressed relative to the concentrations measured in the positive control (glucose). Barplots represent mean values and dots indicate values of each replicate ( $n = 2$  or  $3$ ).

The concentrations of amino acids alanine, asparagine, lysine, phenylalanine, pyroglutamate, tryptophane and tyrosine, were similar compared to glucose or between MO structures (Figure 9). Glutamate displayed slight increases with all MOs compared to glucose for *B. thetaiotaomicron*, *Bacteroides* sp. D2, *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA and *P. vulgatus* strains (fold change between 1.5 and 2.7). Similarly, for all bacteria, proline displayed slight increases with all MOs compared to glucose (fold change between 1.7 and 2.9). Aspartate concentrations were differentially impacted between species: no difference in its production between glucose and MOs were observed for *Bacteroides* sp. D2 and *P. vulgatus* while a moderate (1.5 to 2-fold) and high (4.3 to 6-fold) increase was observed in *B. fragilis* and *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA respectively. Conversely, aspartate concentration in *B. thetaiotaomicron* was 2 to 2.5-fold lower compared to glucose with 2'-FL and 6'-SL respectively (Figure 9). Finally, the concentration of branched amino acids leucine and isoleucine was not modulated or slightly decreased with MOs (0.6 to 1-fold higher compared to glucose) while valine was slightly increased (1.2 to 1.5-fold higher compared to glucose) for all bacteria except *B. fragilis* (Figure 9).

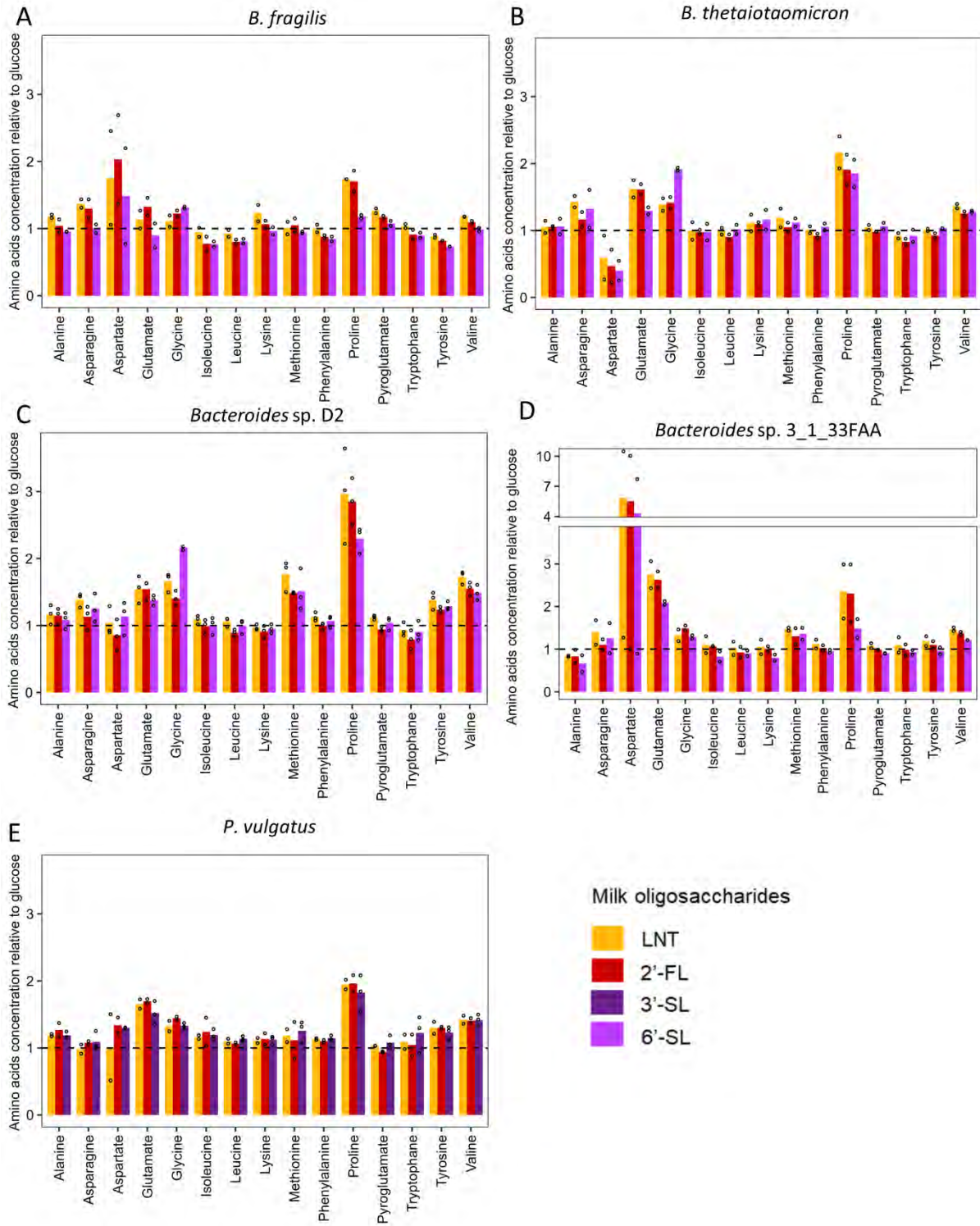


Figure 9: Relative concentration of amino acids after growth in semi-defined media (mYCFA) supplemented with 0.5% lacto-*N*-tetraose (LNT), 2'-fucosyllactose (2'-FL), 3'-sialyllactose (3'-SL) or 6'-sialyllactose (6'-SL) of (A) *B. fragilis* (B) *B. thetaiotaomicron* (C) *Bacteroides sp. D2* (D) *Bacteroides sp. 3\_1\_33FAA* (E) *P. vulgatus*. Data are expressed relative to the concentrations measured in the positive control (glucose). Barplots represent mean values and dots indicate values of each replicate ( $n = 2$  or  $3$ ).

*Identification of glycoside hydrolases in the strain genomes*

Except for *B. uniformis* strain whose DNA extraction was unsuccessful, the genome of the selected strains able to grow or not with MOs, was sequenced (Table 3). Affiliation using whole genome is in agreement with 16S taxonomic affiliation except for two bacteria: *Bacteroides* sp. D2 and *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA. At the strain level, *H. hathewayi* and *P. vulgatus* are the only bacteria showing the same affiliation for 16S and whole genome sequencing.

Table 3: Genome characteristics of the 8 intestinal commensal strains isolated from suckling piglets and rabbits.

ID	Genome length (bp)	GC content (%)	Number of contigs	Specie predicted by genome sequencing (Reference genome)	Specie predicted by 16S ribosomal gene sequencing (Reference sequences)	Average nucleotide identity ANI	Tetra-nucleotide correlation	Jspecies Z score
Isolate_71	5 389 741	43.5	3	<i>Bacteroides fragilis</i> str. I1345	<i>Bacteroides fragilis</i> NCTC 9343	98.50	0.99929	0.99929
Isolate_128	6 514 178	43.1	2	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 1_1_6	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482	98.15	0.99936	0.99936
Isolate_130	6 762 123	41.6	1	<i>Bacteroides</i> sp. D2	<i>NQMG_s</i> KFT8	94.86	0.99916	0.99907
Isolate_55	6 094 260	41.9	12	<i>Bacteroides</i> sp. 3_1_33FAA	<i>Phocaeicola dorei</i> DSM 17855	97.71	0.99864	0.99864
Isolate_30	6 398 705	48.4	2	<i>Hungatella hathewayi</i> DSM 13479	<i>Hungatella hathewayi</i> DSM 13479	98.99	0.99948	0.99948
Isolate_180	5 119 265	42.4	4	<i>Phocaeicola vulgatus</i> ATCC 8482	<i>Phocaeicola vulgatus</i> ATCC 8482	97.73	0.99916	0.99916
Isolate_183	2 233 298	38.0	3	<i>Lactobacillus amylovorus</i> GRL 1112	<i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM 20531	98.07	0.99929	0.9977
Isolate_190	2 246 820	46.6	2	<i>Limosilactobacillus mucosae</i> DSM 13345	<i>Limosilactobacillus mucosae</i> S32	96.87	0.99866	0.99866

To investigate the putative enzymes implicated in the degradation of LNT, 2'-FL, 3'-SL and 6'-SL, the 8 genomes were annotated against the CAZy database. We focused our investigation on GH families targeting the linkages found within the MOs:  $\beta$ -galactosidase, Lacto-N-biosidase,  $\alpha$ -1,2-fucosidase,  $\alpha$ -2,3-sialidase and  $\alpha$ -2,6-sialidase (Figure 2). In the genomes of *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* and *Bacteroides* sp. D2 species, several putative Lacto-N-biosidases from the family GH20 were identified, while the genomes of *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA and *P. vulgatus* contain putative Lacto-N-biosidases of both the GH20 and GH136 families (Table 4). Lacto-N-biosidases might be implicated in the hydrolysis of the LNT into two components, lacto-N-biose (LNB) (Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc) and lactose (Gal( $\beta$ 1-4)Glc). *B. fragilis*, whose consumption of 6'-SL was particularly efficient, possesses 6 putative sialidases (GH33) which target the NeuAc linked in  $\alpha$ 2-3- or  $\alpha$ 2-6- resulting in the release of NeuAc and lactose (Gal( $\beta$ 1-4)Glc). These putative sialidases were also found in the genomes of *B. thetaiotaomicron*, *Bacteroides* sp. D2, *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA and *P. vulgatus* (2 to 4 gene copies) (Table 4). Putative  $\alpha$ -1,2-L-fucosidases (GH95), which target the fucose linked in  $\alpha$ 1-2- to release the Fuc and lactose, are particularly abundant in the *Bacteroides* sp. D2 (10 GH95) and *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA (8 GH95) genomes while *B. fragilis* and *B. thetaiotaomicron* genomes include 4 and 6 GH95, respectively. *P. vulgatus* genome includes 3 putative  $\alpha$ -1,2-L-fucosidases (GH95) (Table 4). We also identified a total of 22, 45 and 36 putative  $\beta$ -galactosidases belonging to the families GH2 and GH35 in the genomes of *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* and *Bacteroides* sp. D2, respectively (Table 4). These enzymes allow the bacteria to hydrolyze lactose (Gal $\beta$ 1-4Glc), issued from the four MOs studied, once it has been freed from the other monosaccharides of the MOs with the mechanisms described above.  $\beta$ -galactosidases are also predicted to hydrolyze the Gal from the lacto-N-biose (Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc( $\beta$ 1-3)) resulting from the LNT hydrolysis by lacto-N-biosidases. *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA and *P. vulgatus* genomes include 25 and 22 putative  $\beta$ -galactosidases respectively from the GH2, GH35 and GH42 families (Table 4). Consequently, the five bacteria that were able to grow with MOs have indeed a large repertoire of GHs in their genome, with copy numbers similar to those we found in CAZy database (Table 4).

Surprisingly, *H. hathewayi*, which was not able to consume any of the MOs studied, has many GHs in its genome (Table 4). Indeed, it possesses 24 putative  $\beta$ -galactosidases (GH1, GH2, GH35 and GH42) along with 4 putative lacto-N-biosidases (GH20 and GH136), 3 putative lacto-N-biose phosphorylases (GH112) and 2 putative sialidases (GH33) which implies that it may be capable of metabolizing LNT and 6'-SL. However, its genome does not include any putative  $\alpha$ -1,2-L-fucosidases, which explains its inability to consume 2'-FL. *L. amylovorus* possesses solely 2 putative  $\beta$ -galactosidases which is consistent with its incapacity to metabolize the MOs. Similarly, *L. mucosae* strain possesses solely 2 putative  $\beta$ -galactosidases along with 5 putative  $\beta$ -1,4-galactosidases (Table 4). However, since they do not possess the enzymes to hydrolyze the lacto-N-biose, the fucose or the sialic acid, they cannot use MOs as a substrate.

Table 4: Copy numbers of MOs-targeted glycoside hydrolase families in strains isolated from suckling rabbits and piglets. \* Numbers in bold are the copy number found in the whole genome annotations \*\*Numbers in italic are the predicted copy number from the CAZy database based on the 16S taxonomic affiliation. \*\*\*NA indicates that the 16S taxonomic affiliation were not found in the CAZy database. GH = Glycoside hydrolase.

GH family	Enzyme activity	Gene copy number							
		<i>B. fragilis</i> (Isolate_71)	<i>B. thetaiotaomicron</i> (Isolate_128)	<i>Bacteroides</i> sp. D2 (Isolate_130)	<i>Bacteroides</i> sp. 3_1_33FAA (Isolate_55)	<i>H. hathewayi</i> (Isolate_30)	<i>P. vulgatus</i> (Isolate_180)	<i>L. amylovorous</i> (Isolate_183)	<i>L. mucosae</i> (Isolate_190)
GH1	$\beta$ -1,4-galactosidase	<b>0*</b> <i>0**</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>NA***</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>8</b> <i>8</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>6</i>	<b>5</b> <i>NA</i>
GH2	$\beta$ -galactosidase	<b>17</b> <i>15</i>	<b>32</b> <i>31</i>	<b>36</b> <i>NA</i>	<b>23</b> <i>27</i>	<b>13</b> <i>13</i>	<b>20</b> <i>25</i>	<b>1</b> <i>1</i>	<b>1</b> <i>NA</i>
GH20	Lacto-N-biosidase	<b>12</b> <i>12</i>	<b>13</b> <i>14</i>	<b>15</b> <i>NA</i>	<b>11</b> <i>10</i>	<b>2</b> <i>2</i>	<b>10</b> <i>9</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>NA</i>
GH33	$\alpha$ -2,3-sialidase; $\alpha$ -2,6-sialidase	<b>6</b> <i>3</i>	<b>2</b> <i>2</i>	<b>4</b> <i>NA</i>	<b>3</b> <i>2</i>	<b>2</b> <i>2</i>	<b>3</b> <i>2</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>NA</i>
GH35	$\beta$ -galactosidase	<b>5</b> <i>4</i>	<b>3</b> <i>3</i>	<b>7</b> <i>NA</i>	<b>1</b> <i>1</i>	<b>1</b> <i>1</i>	<b>1</b> <i>1</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>NA</i>
GH42	$\beta$ -galactosidase	<b>0</b> <i>0</i>	<b>1</b> <i>1</i>	<b>2</b> <i>NA</i>	<b>1</b> <i>1</i>	<b>2</b> <i>2</i>	<b>1</b> <i>1</i>	<b>1</b> <i>1</i>	<b>1</b> <i>NA</i>
GH95	$\alpha$ -1,2-L-fucosidase	<b>4</b> <i>3</i>	<b>6</b> <i>5</i>	<b>10</b> <i>NA</i>	<b>8</b> <i>4</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>3</b> <i>4</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>NA</i>
GH112	Lacto-N-biose phosphorylase	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>NA</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>3</b> <i>3</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>NA</i>
GH136	Lacto-N-biosidase	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>NA</i>	<b>1</b> <i>1</i>	<b>2</b> <i>2</i>	<b>2</b> <i>1</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>NA</i>

## Discussion

Milk oligosaccharides have gathered significant attention in the scientific community due to their impact on the gut microbiota of neonates. Present in all mammalian milks, MOs display considerable structural variation across species. Emerging evidence indicates a correlation between the structure and functions of MOs, suggesting that the molecular assembly of MOs can yield diverse effects on the gut microbiota. However, studies investigating the effects of individual MOs on isolated commensal bacteria are scarce [23,25] and focus mainly on human isolated *Bifidobacteria* [24–29], even though these bacteria are less prevalent in the gut microbiome of young individuals from other mammalian species such as pigs and rabbits [30,31]. In this study, we used culture-dependent methods to isolate newly intestinal commensal bacteria using feces of suckling piglets and cecum content from suckling rabbits and evaluate the impact of individual MOs. Through anaerobic culture methods, we successfully obtained a collection of 240 distinct bacterial isolates.

In rabbits, 36% of the isolates belonged to the facultative anaerobic *Enterobacteriaceae* family, which was also prevalent in the study of Gouet and Fonty (1979) in 21- and 25-days old rabbits. In our study, the use of antibiotics in the culture media reduced the prevalence of this family in subsequent cultures. However, this strategy may have inhibited the growth of other bacteria sensitive to antibiotics. In accordance with previous studies [56], we did not isolate any *Lactobacillaceae* from rabbit cecal contents, while *Bacteroidaceae* emerged as the dominant isolated and cultivated family, comprising 48% of the isolates. Regarding microbiota composition obtained previously by 16S rRNA gene analysis of cecal microbiota, Paës et al. (2022) and Beaumont et al. (2021) reported that, in 25 days old rabbits, *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* are the most abundant family. Consequently, the main taxa from the microbiota of rabbits are represented in our isolates. This validates our culture-based approach and confirm that our collection is representative of the rabbit intestinal microbiota. In piglets, the primary phyla isolated in feces were *Bacillota* (formerly *Firmicutes*) and *Pseudomonadota* (formerly *Proteobacteria*) in line with other culture-dependent studies [59,60]. The main families isolated in our study were *Enterobacteriaceae* (37%), *Lactobacillaceae* (16%), *Streptococcaceae* (15%) and *Bacteroidaceae* (11%), which are not the most dominant on the fecal microbiota of piglets [61], pointing out that culture-dependent isolated families are overrepresented in comparison to the original microbial community in this host. At the genera level, the ones found as dominant – 37% of *Escherichia*, 15% of *Lactobacillus* (including *Ligilactobacillus* and *Limosilactobacillus*, in accordance with prior taxonomic classifications) and 15% of *Streptococcus* – are the same ones found in a previous culture-dependent study [59]. Including *Phocaeicola*, previously classified as *Bacteroides* [62], the genus *Bacteroides* becomes the fourth most abundant isolated genera. Similar observations were made by Wang et al. (2021), who detected *Bacteroides* in nursing piglets and concluded that it could possibly be linked to the consumption of milk-derived proteins, lactose and galactose. In general, culture-dependent methods used in this study have been effective for recovering bacteria for subsequent *in vitro* experiments; however, they have limits and only a subset of microorganisms is normally identified as several species in the microbiota may not be cultivable with the current methods. For future studies, it may

be interesting to develop new media and culture conditions to capture what is not currently cultivable.

Among the 240 isolated bacteria, we selected two *Bacteroidaceae* from the pig isolates collection, along with four *Bacteroidaceae* and one *Lachnospiraceae* from rabbit gut isolates as these species possess a putative range of GHs predicted to degrade MOs. We also included two *Lactobacillaceae* due to their probiotic potential. We cultivated them with LNT, 2'-FL, and 3'-SL or 6'-SL for piglets and rabbits respectively as sole carbon source.

Our findings indicate that four *Bacteroides* and one *Phocaeicola* strains (formerly classified as *Bacteroides* [62]) isolated from suckling rabbits and piglets were able to consume MOs. The ability of *Bacteroides* species to metabolize MOs has been described in previous research [32,33,63,64]. *Bacteroides* are known for their capacity to utilize complex carbohydrates, particularly mucin glycans, thanks to the presence of polysaccharide utilization loci (PUL) in their genomes. Notably, Marcobal et al. (2011) showed that *B. thetaiotaomicron* employs PUL associated with mucin utilization when grown on MOs. The only *Bacteroides* strain in our study that could not grow on MOs is to *B. uniformis*, consistent with previous findings [65,66]. Our results indicate that ability to utilize MOs are species-dependent, which aligns with the six *Bacteroides* species observations from Marcobal et al. (2011).

Interestingly, the growth and MO consumption patterns of the strains appeared to depend on the specific structure of the MOs. While 2'-FL resulted in an important growth across all species, 3'-SL or 6'-SL and LNT were more selective. *B. fragilis* responded to the three types of MOs with robust growth. This finding corroborates with the results found by Marcobal et al. (2010), who reported high consumption rates of nearly all MO structures by *B. fragilis* from a mixture of 14 structures. *B. thetaiotaomicron* exhibited robust growth with 2'-FL but showed reduced capacity to consume 6'-SL, contrasting with the results obtained by Chia et al. (2020), who observed an important utilization of 6'-SL by *B. thetaiotaomicron* with less than 50% of 6'-SL left in the supernatant after 48h of degradation of a mix of MOs. They also reported the utilization of monosaccharides belonging to LNT and 2'-FL by *B. thetaiotaomicron* throughout the degradation of a mix of MOs with an absence of residues of GlcNAc and Fuc. In our study, we also did not find GlcNAc in the supernatant after growth of *B. thetaiotaomicron* with LNT. However, after growth with 2'-FL we observed considerable levels of Fuc indicating that *B. thetaiotaomicron* is unable to efficiently metabolize this monosaccharide in our experimental conditions. These divergences in results could be attributed to differences in the strains used in the studies (VPI-5428 in Chia et al. (2020) vs 1\_1\_6 in our study), and the fact that they cultured the bacteria with a mixture of MOs, while we used single MOs. Similarly, our results with *Bacteroides* sp. D2 demonstrated efficient growth with both 2'-FL and LNT but poor utilization of 6'-SL. *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA exhibited substantial growth with all three MOs, with minimal residues of MOs remaining in the supernatant during the stationary phase. Kijner, Cher, Yassour (2022) demonstrated the ability of *P. dorei*, a species closely related to *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA to grow with LNT, 2'-FL and 6'-SL. *P. vulgatus* grew with all three MOs, although growth was notably less pronounced with 3'-SL. In our study, *P. vulgatus* showed a preference for 2'-FL, consistent with findings from Marcobal et al. (2010). Their study found that the fucosylated MOs were the most consumed by *P. vulgatus* ATCC8482, as

they were present in the lowest amounts in the supernatant after growth with a mixture of MOs.

The five strains metabolized the MOs into various metabolites, with production patterns depending on the structure of the MOs. Specifically, 2'-FL stimulated the production of propionate and the BCFAs isovalerate, isobutyrate and 2-methylbutyrate. We expected a reduction of leucine and isoleucine levels, precursors for BCFAs present in the YCFA media, possibly due to their utilization for the production of BCFAs [68], however they were not reduced when bacteria were grown with MOs compared to glucose. Several bacterial species have already shown an increase in the production of branched chain fatty acids in a peptone yeast medium compared to a peptone yeast medium with glucose [69]. The presence of carbohydrates was hypothesized to inhibit the proteolytic activity of the bacteria. MOs being less accessible than glucose, degradation of these carbohydrates is longer and proteolytic activity might consequently be higher with MOs. One notable difference in metabolite production based on MOs structure was the pronounced increase in 1,2-propanediol with 2'-FL in all bacteria tested. This metabolite, also known as propyleneglycol, has previously been identified as a product of fucose metabolism in *Bifidobacterium* species and *Akkermansia muciniphila* [14,16,70,71]. 1,2-propanediol is an intermediary metabolite derived from the microbial degradation of deoxyhexose sugars like fucose and is involved in the production of propionate [72]. However, studies suggest that *Bacteroides* species typically produce 1,2-propanediol as their final product [73]. We hypothesize that, following hydrolysis of 2'-FL, *Bacteroides* species might utilize the glucose and galactose residues to produce propionate while converting fucose into 1,2-propanediol.

The analysis of the genome indicates that the five species possess a repertoire of GHs, aimed at all MOs structures investigated. All strains possess lacto-N-biosidase, to cleave the LNT in lacto-N-biose (Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc) and lactose (Gal( $\beta$ 1-4)Glc), and  $\beta$ -glucosidase to cleave the lactose, however they lack the lacto-N-biose phosphorylase required to cleave the lacto-N-biose. This could explain the low quantities of N-acetylglucosamine detected in the supernatant at the end of the culture, this monomer not being released from the lacto-N-biose. Among the *Bacteroidetes* studied, all had several GH33 in their genome. GH33 which acts by separating the lactose and the sialic acid residue was found in the genome of *B. thetaiotaomicron* in two different PUL suggesting that *Bacteroidetes* species utilize different mechanisms to metabolize MOs [66]. Despite the low consumption of 6'-SL by *B. thetaiotaomicron*, we found 6-fold higher NeuAc than in the uninoculated medium. This can be explained by the lack of the enzymes specialized in the metabolization of sialic acid [74]. On the contrary, *B. fragilis* had the same amount of NeuAc left in the medium as *B. thetaiotaomicron* for a higher consumption of MOs, which suggests that the bacterium can metabolize NeuAc. Marcobal et al. (2011) already demonstrated that *B. fragilis* has an extensive set of genes dedicated to sialylated MOs including genes to catabolize NeuAc after cleavage from the 6'-SL [41].

None of the *Lactobacillaceae* strains tested were able to grow on MOs, which is consistent with the absence of GHs in their genome, and prior studies showing little (2'-FL, LNnT) to no

growth (3'-SL) of bacteria from this family with MOs [33,75]. Thongaram et al. (2017) reported moderate growth of several *Lactobacillus* strains on LNnT, yet they had the ability to consume monosaccharide components of LNnT, which are similar to those of LNT (Glc, Gal and GlcNAc) [75,76]. Therefore, *in vivo*, *Lactobacillaceae* could take advantage of monosaccharides released from MOs by other bacterial species present in the gut microbiota. Similarly, *H. hathewayi*, was not efficient at utilizing MOs. Although no studies have directly tested this species with MOs, our investigation did reveal the presence of multiple GHs in its genome. The absence of degradation observed could be due to the absence of extracellular GHs and/or specialized transporters to capture, and import MOs to be metabolized intracellularly [77].

### Conclusion

We demonstrated the ability of newly isolated *Bacteroides* and *Phocaeicola* commensal bacteria, from suckling piglets and rabbits, to selectively consume MOs, with growth and metabolic profiles dependent on the structure of these molecules. Notably, growth with 2'-FL resulted in higher bacterial biomass for all bacteria and 1,2-propanediol and isobutyrate productions were different compared to the other MOs. Genomic analyses revealed an abundance of GHs in the genome of these bacteria, suggesting a genetic adaptation that facilitates the utilization of MOs. The ability of these commensal bacteria to thrive in the presence of MOs suggests that these compounds could be used to modulate the gut microbiota. Furthermore, the increased production of certain metabolites after MOs degradation could impact host health. The study of the effects of these metabolites on the intestinal barrier function could provide a better understanding of the role of MOs in health. One of the limits of our study is the actual state of the art on sequences assembly as well as the actual thresholds defined for species identification, which evolves rapidly inducing new taxonomical reorganizations. This limit, which is common to all the studies using microbial genomes, is a view of the complexity of the bacteria communities. Besides, a deeper analysis of the culture conditions increasing MO degradation has not been done to our knowledge up to day, which could indicate that the actual techniques used to study MO degradation could benefit from other culture methods than the ones employed until now. Furthermore, our study highlights the need of future in-depth analysis of genome sequences associated with bacterial genetic engineering which will be key to validate enzymatic capacity of bacteria to degrade MOs and even to identify new GH and the pathways involved. In addition, in-depth analysis of changes in metabolites during the degradation of MOs could reveal specific metabolic pathways and key intermediates in the degradation of MOs that are unknown until now.

### Abbreviations

2'-FL: 2'-fucosyllactose

3'-SL: 3'-sialyllactose

6'-SL: 6'-sialyllactose

ANI: Average nucleotide identity

BBE: *Bacteroides* bile esculin agar

BCFA: Branched chain fatty acid

BHIS: Brain heart infusion  
 CAZyme: Carbohydrate active enzyme  
 CG: Gas chromatograph  
 Fuc: Fucose  
 Gal: Galactose  
 GAM: Gifu Anaerobic Medium  
 GH: Glycoside hydrolase  
 Glc: Glucose  
 GlcNAc: N-acetylglucosamine  
 HMOs: Human milk oligosaccharides  
<sup>1</sup>H-NMR: <sup>1</sup>H-Nuclear magnetic resonance  
 LKV: Laked Brucella Blood Agar  
 LNB: Lacto-N-biose  
 LNT: Lacto-N-tetraose  
 MO: Milk oligosaccharides  
 MRS: Man Rogosa and Sharpe  
 NeuAc: N-acetylneuraminic acid  
 OD: Optical density  
 PUL: Polysaccharide utilization loci  
 RCM: Reinforced Clostridial medium  
 SCFA: Short chain fatty acid  
 YCFA: Yeast extract casitone and fatty acid broth

### Declarations

#### **Ethics approval**

The animals were raised in our INRAE experimental facilities ; for pigs : UE1421 UEPR, Saint-Gilles, France; Agreement No. D35-275-32,<https://doi.org/10.15454/1.5573932732039927E12>, for rabbit: the INRAE PECTOUL experimental facility (GenPhySE, Castanet-Tolosan, France) <https://doi.org/10.17180/ftvh-x393>). All animal handling was conducted in accordance with the current ethical standards of the European Community (Directive 2010/63/EU), and the French legislation on animal experimentation and ethics. The experiment received the approval of the local ethics committee: Ethical committee in animal experimentation (CEEA) "Science et santé animales CEEA-115" and "Comité Rennais d'Ethique en matière d'Expérimentation Animal CEEA-007" for rabbits and pigs respectively. The approvals are registered under the numbers SSA\_2021\_001 and APAFIS #35552-2022022312418292 v3 for rabbits and pigs, respectively).

#### **Consent for publication**

Not applicable

#### **Availability of data and materials**

All data generated or analyzed during this study are included in this published article [and its supplementary information files]. Sequences are available at European Nucleotide Archive (ENA) repository under the reference PRJEB86776. Isolated strains used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests

### **Funding**

This work was supported by the ANR (HoloOLIGO project, ANR-21-CE20-0045-01), the INRAE metaprogram (Holoflux). Funders had no role in the review process.

### **Authors' contributions**

MR: Perform the experiments, Analyze the data, Writing – original draft. SCh: Perform the experiments. FP: Perform the experiments. MB: Perform the experiments, Analyze the data. CV: Perform the experiments, Analyze the data. AJ: Perform the experiments. CVan: Analyze the data. LC: Analyze the data. GP: Analyze the data. PL: Review the manuscript. CK: Conceptualization, Writing – review & editing, Supervision. SC: Conceptualization, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition. RM: Conceptualization, Writing – review & editing, Supervision. All authors read and approved the final manuscript.

### **Acknowledgements**

The authors thank all the staff at the PECToul and UE3P experimental units for their care of the animals. The authors acknowledge Inbiose for supplying the milk oligosaccharides. Funders had no role in the review process.

### **References**

1. Rumeau M, Fenaille F, Girard A, Loux V, Ba M, Nédellec C, et al. MilkOligoThesaurus, a dataset of mammalian milk oligosaccharide synonyms. *Data in Brief*. 2024 Jun;54:110404.
2. Fox PF, Uniacke-Lowe T, McSweeney PLH, O'Mahony JA. *Biologically Active Compounds in Milk*. In: *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 415–97.
3. Carr LE, Virmani MD, Rosa F, Munblit D, Matazel KS, Elolimy AA, et al. Role of Human Milk Bioactives on Infants' Gut and Immune Health. *Frontiers in Immunology*. 2021 Feb 12;12.
4. Xu G, Davis JC, Goonatilleke E, Smilowitz JT, German JB, Lebrilla CB. Absolute Quantitation of Human Milk Oligosaccharides Reveals Phenotypic Variations during Lactation. *The Journal of Nutrition*. 2017 Jan;147(1):117–24.

5. Engfer MB, Stahl B, Finke B, Sawatzki G, Daniel H. Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2000 Jun;71(6):1589–96.
6. Apostolidis E, Kwon Y, Shinde R, Ghaedian R, Shetty K. Inhibition of *Helicobacter pylori* by Fermented Milk and Soymilk Using Select Lactic Acid Bacteria and Link to Enrichment of Lactic Acid and Phenolic Content. *Food Biotechnology*. 2011;25(1):58–76.
7. Coppa GV, Zampini L, Galeazzi T, Facinelli B, Ferrante L, Capretti R, et al. Human Milk Oligosaccharides Inhibit the Adhesion to Caco-2 Cells of Diarrheal Pathogens: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella fytis*. *Pediatric Research*. 2006 Mar;59(3):377–82.
8. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2017 Aug;14(8):491–502.
9. Urashima T, Saito T, Nakamura T, Messer M. Oligosaccharides of milk and colostrum in non-human mammals. *Glycoconjugate Journal*. 2001 May;18(5):357–71.
10. Mijan MA, Lee YK, Kwak HS. Classification, Structure, and Bioactive Functions of Oligosaccharides in Milk. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 2011 Oct 31;31(5):631–40.
11. Chen X. Human Milk Oligosaccharides (HMOS). In: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Elsevier; 2015. p. 113–90.
12. Bode L. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*. 2012 Sep 1;22(9):1147–62.
13. Grondin JM, Tamura K, Déjean G, Abbott DW, Brumer H. Polysaccharide Utilization Loci: Fueling Microbial Communities. O’Toole G, editor. *Journal of Bacteriology*. 2017 Aug;199(15).
14. James K, Bottacini F, Contreras JIS, Vigoureux M, Egan M, Motherway MO, et al. Metabolism of the predominant human milk oligosaccharide fucosyllactose by an infant gut commensal. *Scientific Reports*. 2019 Oct 28;9(1):15427.
15. Šuligoj T, Vignæs LK, Abbeele PV den, Apostolou A, Karalis K, Savva GM, et al. Effects of Human Milk Oligosaccharides on the Adult Gut Microbiota and Barrier Function. *Nutrients*. 2020 Sep;12(9):2808.
16. Kostopoulos I, Elzinga J, Ottman N, Klievink JT, Blijenberg B, Aalvink S, et al. *Akkermansia muciniphila* uses human milk oligosaccharides to thrive in the early life conditions in vitro. *Scientific Reports*. 2020 Aug 31;10(1):14330.
17. Peng L, Li ZR, Green RS, Holzmann IR, Lin J. Butyrate Enhances the Intestinal Barrier by Facilitating Tight Junction Assembly via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Caco-2 Cell Monolayers<sup>12</sup>. *The Journal of Nutrition*. 2009 Sep 1;139(9):1619–25.
18. Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*. 2011 Jan;469(7331):543–7.

19. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*. 2013 Sep 1;54(9):2325–40.
20. Gonçalves P, Araújo JR, Di Santo JP. A Cross-Talk Between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and the Host Mucosal Immune System Regulates Intestinal Homeostasis and Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2018 Feb 15;24(3):558–72.
21. Zhang H, Xie Y, Cao F, Song X. Gut microbiota-derived fatty acid and sterol metabolites: biotransformation and immunomodulatory functions. *Gut Microbes*. 16(1):2382336.
22. LoCascio RG, Ninonuevo MR, Freeman SL, Sela DA, Grimm R, Lebrilla CB, et al. Glycoprofiling of Bifidobacterial Consumption of Human Milk Oligosaccharides Demonstrates Strain Specific, Preferential Consumption of Small Chain Glycans Secreted in Early Human Lactation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007 Oct 1;55(22):8914–9.
23. Cheng L, Kiewiet M, Logtenberg M, Groeneveld A, Nauta A, Schols H, et al. Effects of Different Human Milk Oligosaccharides on Growth of Bifidobacteria in Monoculture and Co-culture With *Faecalibacterium prausnitzii*. *Frontiers in Microbiology*. 2020 Oct 30;11.
24. Ward RE, Niñonuevo M, Mills DA, Lebrilla CB, German JB. In Vitro Fermentation of Breast Milk Oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Jun;72(6):4497–9.
25. LoCascio RG, Niñonuevo MR, Kronewitter SR, Freeman SL, German JB, Lebrilla CB, et al. A versatile and scalable strategy for glycoprofiling bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides. *Microbial Biotechnology*. 2009;2(3):333–42.
26. Ruiz-Moyano S, Totten SM, Garrido DA, Smilowitz JT, German JB, Lebrilla CB, et al. Variation in Consumption of Human Milk Oligosaccharides by Infant Gut-Associated Strains of *Bifidobacterium breve*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013 Sep 1;79(19):6040–9.
27. Katayama T. Host-derived glycans serve as selected nutrients for the gut microbe: human milk oligosaccharides and bifidobacteria†. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2016 Apr 2;80(4):621–32.
28. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR. 2017 Nov 8;81(4):e00036-17.
29. Ma X, Mo J, Shi L, Cheng Y, Feng J, Qin J, et al. Isolation and characterization of *Bifidobacterium* spp. from breast milk with different human milk oligosaccharides utilization and anti-inflammatory capacity. *Food Research International*. 2024 Nov 1;196:115092.
30. Combes S, Michelland RJ, Monteils V, Cauquil L, Soulié V, Tran NU, et al. Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity: Postnatal development of rabbit caecal microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*. 2011 Sep;77(3):680–9.

31. Luo Y, Ren W, Smidt H, Wright ADG, Yu B, Schyns G, et al. Dynamic Distribution of Gut Microbiota in Pigs at Different Growth Stages: Composition and Contribution. *Microbiology Spectrum*. 2022 May 18;10(3):e00688-21.
32. Marcobal A, Barboza M, Froehlich JW, Block DE, German JB, Lebrilla CB, et al. Consumption of Human Milk Oligosaccharides by Gut-Related Microbes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010 May 12;58(9):5334–40.
33. Salli K, Hirvonen J, Siitonen J, Ahonen I, Anglenius H, Maukonen J. Selective Utilization of the Human Milk Oligosaccharides 2'-Fucosyllactose, 3-Fucosyllactose, and Difucosyllactose by Various Probiotic and Pathogenic Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2021 Jan 13;69(1):170–82.
34. Rashwan AA, Marai IFM. Mortality in young rabbits: a review. *World Rabbit Science*. 2000;8(3):111–24.
35. Lallès JP, Bosi P, Smidt H, Stokes CR. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2007 May;66(2):260–8.
36. Moeser AJ, Pohl CS, Rajput M. Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. *Animal Nutrition*. 2017 Dec 1;3(4):313–21.
37. Alzohairy A. BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*. 2011 Jan 1;2:60–1.
38. EzBioCloud.net | Search about Bacteria or Archaea [Internet]. [cited 2025 Jan 14]. Available from: <https://www.ezbiocloud.net/>
39. Salcedo J, Frese SA, Mills DA, Barile D. Characterization of porcine milk oligosaccharides during early lactation and their relation to the fecal microbiome. *Journal of dairy science*. 2016 Oct;99(10):7733–43.
40. Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*. 2009 Jan;37(Database issue):D233–8.
41. Marcobal A, Barboza M, Sonnenburg ED, Pudlo N, Martens EC, Desai P, et al. Bacteroides in the Infant Gut Consume Milk Oligosaccharides via Mucus-Utilization Pathways. *Cell Host & Microbe*. 2011 Nov;10(5):507–14.
42. Ioannou A, Knol J, Belzer C. Microbial Glycoside Hydrolases in the First Year of Life: An Analysis Review on Their Presence and Importance in Infant Gut. *Front Microbiol*. 2021 May 28;12:631282.
43. Varki A, Cummings RD, Aebi M, Packer NH, Seeberger PH, Esko JD, et al. Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans. *Glycobiology*. 2015 Dec;25(12):1323–4.
44. Duncan SH, Louis P, Thomson JM, Flint HJ. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*. 2009;11(8):2112–22.

45. Watson D, O'Connell Motherway M, Schoterman MHC, van Neerven RJJ, Nauta A, van Sinderen D. Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2013 Apr 1;114(4):1132–46.
46. Lefort G, Liaubet L, Canlet C, Tardivel P, Père MC, Quesnel H, et al. ASICS: an R package for a whole analysis workflow of 1D 1H NMR spectra. *Bioinformatics*. 2019 Nov 1;35(21):4356–63.
47. SMRT Link - PacBio [Internet]. [cited 2025 Jan 14]. Available from: <https://www.pacb.com/smrt-link/>
48. Seppey M, Manni M, Zdobnov EM. BUSCO: Assessing Genome Assembly and Annotation Completeness. Kollmar M, editor. *Gene Prediction*. 2019 Apr 25;1962:227–45.
49. Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*. 2016 Mar 15;32(6):929–31.
50. Zheng J, Ge Q, Yan Y, Zhang X, Huang L, Yin Y. dbCAN3: automated carbohydrate-active enzyme and substrate annotation. *Nucleic Acids Research*. 2023 Jul 5;51(W1):W115–21.
51. Sprouffske K, Wagner A. Growthcurver: an R package for obtaining interpretable metrics from microbial growth curves. *BMC Bioinformatics*. 2016 Dec;17(1):172.
52. Rohart F, Gautier B, Singh A, Cao KAL. mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLOS Computational Biology*. 2017 Nov 3;13(11):e1005752.
53. Read T, Fortun-Lamothe L, Pascal G, Le Boulch M, Cauquil L, Gabinaud B, et al. Diversity and Co-occurrence Pattern Analysis of Cecal Microbiota Establishment at the Onset of Solid Feeding in Young Rabbits. *Frontiers in Microbiology*. 2019 May 10;10.
54. Shen J, Zhang J, Zhao Y, Lin Z, Ji L, Ma X. Tibetan Pig-Derived Probiotic *Lactobacillus amylovorus* SLZX20-1 Improved Intestinal Function via Producing Enzymes and Regulating Intestinal Microflora. *Frontiers in Nutrition*. 2022 Mar 29;9.
55. Dang D, Liu X, Chen H, Zhao J, Chen W, Yang B. *In silico, in vitro* and *in vivo* safety assessment of three *Limosilactobacillus mucosae* strains for probiotic candidates. *Food Bioscience*. 2024 Feb 1;57:103462.
56. Gouet Ph, Fonty G. Changes in the digestive microflora of holoxenic \* rabbits from birth until adulthood. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*. 1979;19(3A):553–66.
57. Paës C, Gidenne T, Bébin K, Duperray J, Gohier C, Guené-Grand E, et al. Early Introduction of Plant Polysaccharides Drives the Establishment of Rabbit Gut Bacterial Ecosystems and the Acquisition of Microbial Functions. *mSystems*. 2022 Jun 8;7(3):e00243-22.
58. Beaumont M, Mussard E, Barilly C, Lencina C, Gress L, Painteaux L, et al. Developmental Stage, Solid Food Introduction, and Suckling Cessation Differentially Influence the Comaturation of the Gut Microbiota and Intestinal Epithelium in Rabbits. *The Journal of Nutrition*. 2021 Dec 7;152(3):723.

59. Wang X, Howe S, Wei X, Deng F, Tsai T, Chai J, et al. Comprehensive Cultivation of the Swine Gut Microbiome Reveals High Bacterial Diversity and Guides Bacterial Isolation in Pigs. Methe B, editor. *mSystems*. 2021 Aug 31;6(4):e00477-21.
60. Mun D, Kim H, Shin M, Ryu S, Song M, Oh S, et al. Decoding the intestinal microbiota repertoire of sow and weaned pigs using culturomic and metagenomic approaches. *Journal of Animal Science and Technology*. 2021 Nov;63(6):1423–32.
61. Luise D, Le Sciellour M, Buchet A, Resmond R, Clement C, Rossignol MN, et al. The fecal microbiota of piglets during weaning transition and its association with piglet growth across various farm environments. Zoetendal EG, editor. *PLoS ONE*. 2021 Apr 27;16(4):e0250655.
62. García-López M, Meier-Kolthoff JP, Tindall BJ, Gronow S, Woyke T, Kyrpides NC, et al. Analysis of 1,000 Type-Strain Genomes Improves Taxonomic Classification of Bacteroidetes. *Frontiers in Microbiology*. 2019 Sep 23;10:2083.
63. Yu ZT, Chen C, Newburg DS. Utilization of major fucosylated and sialylated human milk oligosaccharides by isolated human gut microbes. *Glycobiology*. 2013 Nov;23(11):1281–92.
64. Chia LW, Mank M, Blijenberg B, Aalvink S, Bongers RS, Stahl B, et al. *Bacteroides thetaiotaomicron* Fosters the Growth of Butyrate-Producing *Anaerostipes caccae* in the Presence of Lactose and Total Human Milk Carbohydrates. *Microorganisms*. 2020 Oct 1;8(10):1513.
65. Buzun E, Hsu CY, Sejane K, Oles RE, Vasquez Ayala A, Loomis LR, et al. A bacterial sialidase mediates early-life colonization by a pioneering gut commensal. *Cell Host & Microbe*. 2024 Feb;32(2):181-190.e9.
66. Kijner S, Ennis D, Shmorak S, Florentin A, Yassour M. CRISPR-Cas-based identification of a sialylated human milk oligosaccharides utilization cluster in the infant gut commensal *Bacteroides dorei*. *Nature Communications*. 2024 Jan 2;15(1):105.
67. Kijner S, Cher A, Yassour M. The Infant Gut Commensal *Bacteroides dorei* Presents a Generalized Transcriptional Response to Various Human Milk Oligosaccharides. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022 Mar 18;12.
68. Ríos-Covián D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de los Reyes-Gavilán CG, Salazar N. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Frontiers in Microbiology*. 2016 Feb 17;7.
69. Allison MJ. Production of branched-chain volatile fatty acids by certain anaerobic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1978 May;35(5):872–7.
70. Bunesova V, Lacroix C, Schwab C. Fucosyllactose and L-fucose utilization of infant *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium kashiwanohense*. *BMC Microbiology*. 2016 Oct 26;16(1):248.
71. Schwab C, Ruscheweyh HJ, Bunesova V, Pham VT, Beerenwinkel N, Lacroix C. Trophic Interactions of Infant *Bifidobacteria* and *Eubacterium hallii* during L-Fucose and Fucosyllactose Degradation. *Frontiers in Microbiology*. 2017 Jan 30;8:95.

72. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*. 2017;19(1):29–41.
73. Saxena RK, Anand P, Saran S, Isar J, Agarwal L. Microbial production and applications of 1,2-propanediol. *Indian Journal of Microbiology*. 2010 Mar 1;50(1):2–11.
74. Brigham C, Caughlan R, Gallegos R, Dallas MB, Godoy VG, Malamy MH. Sialic Acid ( *N* -Acetyl Neuraminic Acid) Utilization by *Bacteroides fragilis* Requires a Novel *N* -Acetyl Mannosamine Epimerase. *Journal of Bacteriology*. 2009 Jun;191(11):3629–38.
75. Thongaram T, Hoeflinger J, Chow J, Miller M. Human milk oligosaccharide consumption by probiotic and human-associated bifidobacteria and lactobacilli. *Journal of dairy science*. 2017 Oct;100(10):7825–33.
76. Schwab C, Gänzle M. Lactic acid bacteria fermentation of human milk oligosaccharide components, human milk oligosaccharides and galactooligosaccharides: LAB fermentation of HMOs and GOSs. *FEMS Microbiology Letters*. 2011 Feb 1;315(2):141–8.
77. Garrido D, Dallas DC, Mills DA. Consumption of human milk glycoconjugates by infant-associated bifidobacteria: mechanisms and implications. *Microbiology*. 2013 Apr 1;159(Pt\_4):649–64.

### Supplementary data

Table S1: Characteristics of the individuals sampled for the experiments

Individual	Pig 1	Pig 2	Pig 3	Rabbit 1	Rabbit 2	Rabbit 3
Genetic	Piétrain x (Large White x Landrace)			INRAE 1777		
Sex	Female	Male	Male			
Age at sampling	28 days			16 days	23 days	
Body weight (Kg)	9.36	8.94	8.28	0.315	0.438	0.428

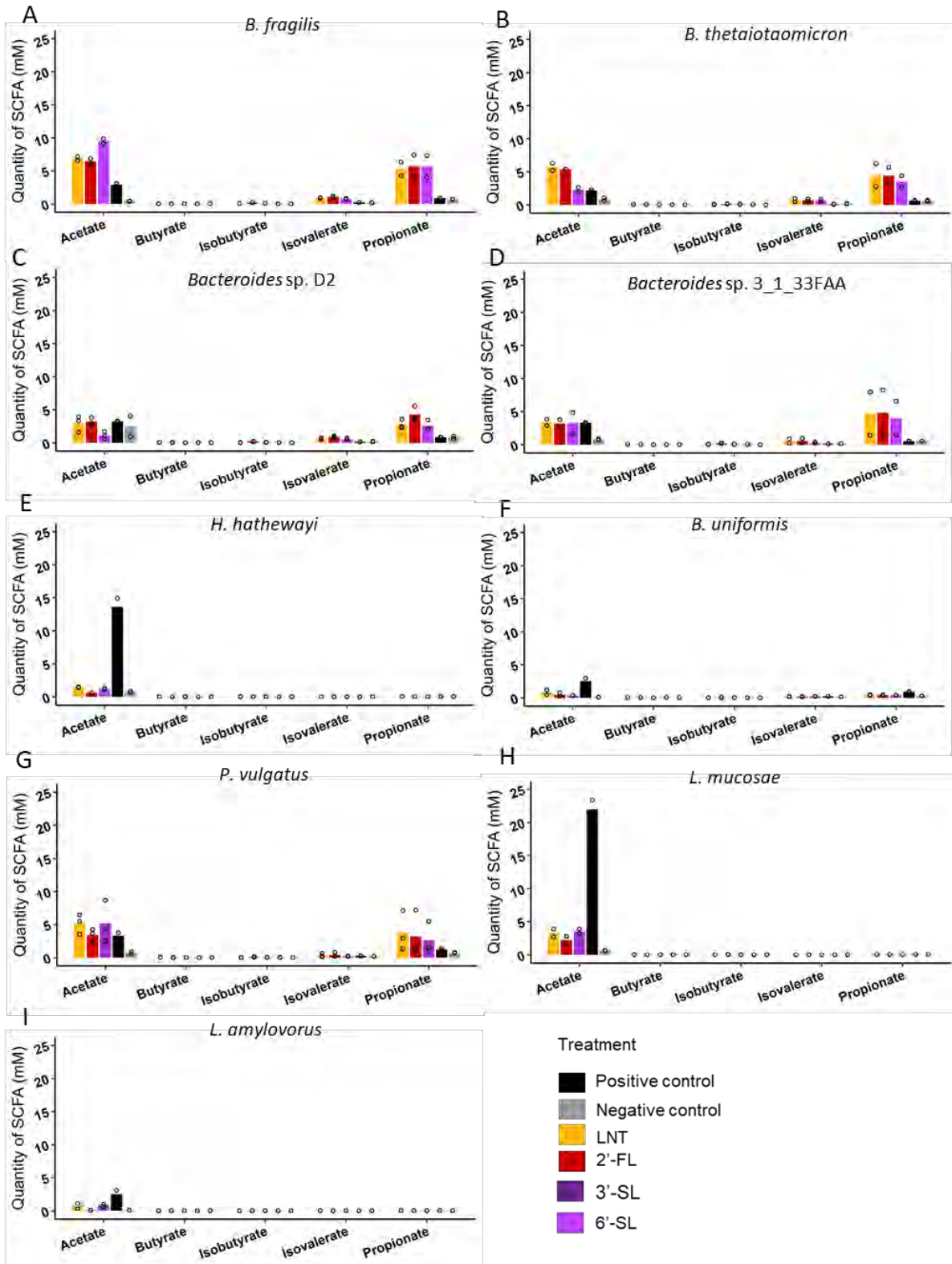
Table S2: List of primers used to amplify the whole 16S rRNA gene

Host	Direction	Sequence (5'-3')
Rabbit	Forward	ACGGCTACCTTGTTACGACTT
	Reverse	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
Pig	Forward	AGAGTTTGATCATGGCTCA
	Reverse	TACGGTTACCTTGTTACGACTT

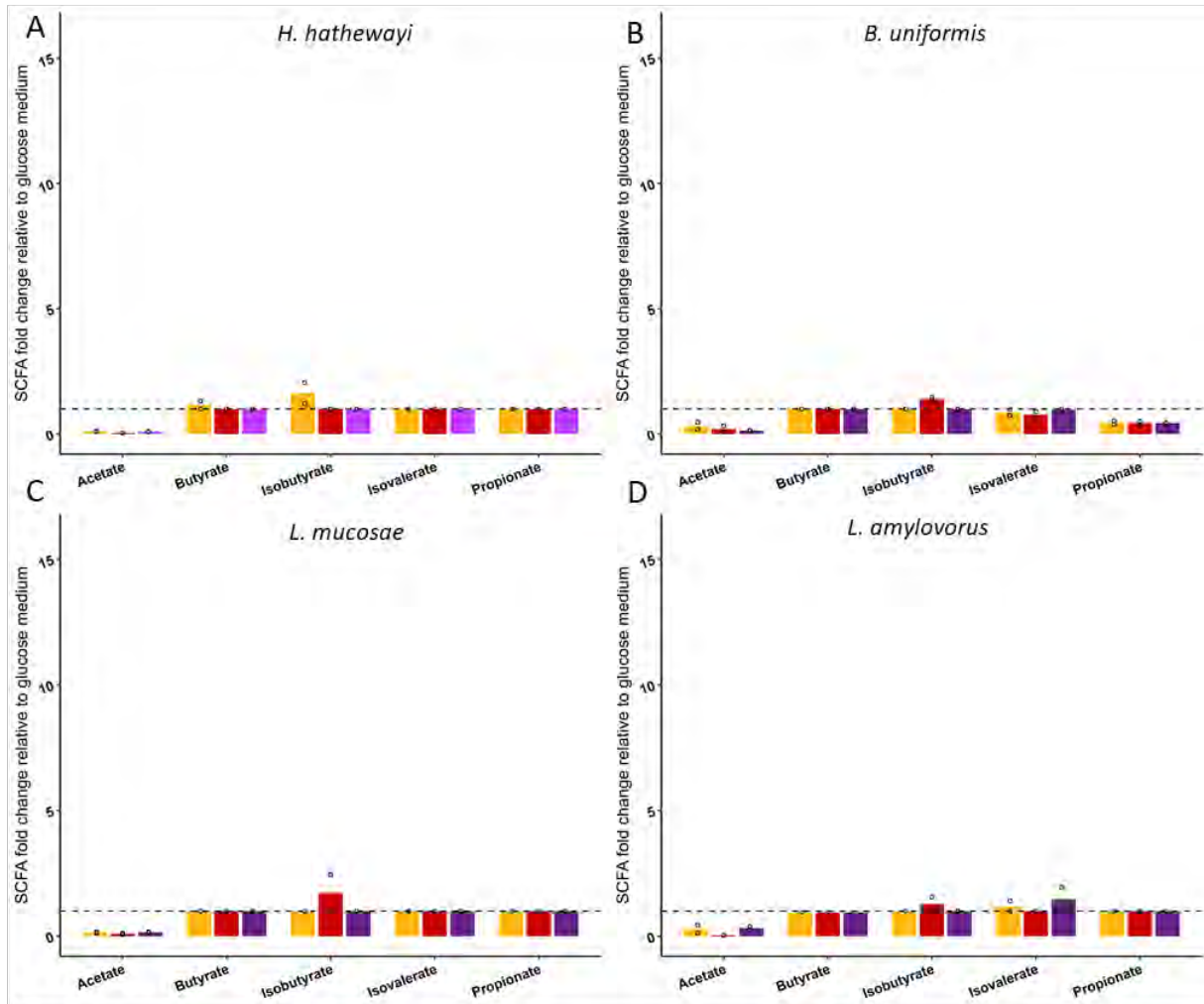
Table S4: Metabolites identified by <sup>1</sup>H-NMR metabolomics in bacterial culture supernatants

	Metabolites	δH (ppm)
1	2-methylbutyrate	0.86* (m), 1.05 (d), 1.39 (m), 1.50 (m), 2.20 (m)
2	Isovalerate	0.92* (d), 1.98 (m), 2.12 (d)
3	Leucine	0.97* (m), 1.72 (m), 3.74 (m)
4	Valine	0.99 (d), 1.05* (d), 2.28 (m), 3.62 (d)
5	Isoleucine	0.94 (m), 1.15* (d), 1.26 (m), 1.47 (m), 1.98 (m), 3.68 (d)
6	Propionate	1.06* (m), 2.19 (m)
7	1,2-propanediol	1.15* (d), 3.45 (m), 3.55 (m), 3.89 (m)
8	Ethanol	1.19* (m)
9	Fucose	1.21* (d), 1.25 (d), 3.36 (s), 3.46 (m), 3.65 (m), 3.79 (m), 4.20 (m), 4.56 (d), 4.80 (s), 5.21 (d)
10	Alanine	1.49* (d), 3.79 (m)
12	Acetate	1.92* (s)
11	N-acetylneuraminic acid	1.83 (m), 2.06* (d), 2.22 (m), 3.53 (d), 3.62 (m), 3.77 (m), 3.84 (d), 3.86 (d), 3.92 (m), 3.98 (m)
13	Glutamate	2.07 (m), 2.36* (m), 3.77 (m)
14	Succinate	2.41* (s)
15	Pyroglutamate	2.041 (m), 2.41 (m), 2.51* (m), 4.18 (m)
16	Methionine	2.14 (s), 2.20 (m), 2.65* (m), 3.86 (m)
17	3'-sialyllactose	1.18 (m), 1.92 (s), 2.04 (s), 2.76* (m), 3.30 (m), 3.57 (m), 4.11 (m), 4.53 (d), 4.68 (d), 4.8 (s), 5.24 (d)
18	Aspartate	2.69 (m), 2.80* (d), 2.83 (d), 3.90 (m)
19	Asparagine	2.86 (m), 2.89 (m), 2.94* (m), 2.97 (m)
20	Lysine	1.49 (m), 1.74 (m), 1.92 (m), 3.03* (m), 3.76 (m)
21	Betaine	3.27* (s)
22	Proline	3.35* (m), 4.13 (m)
23	Glucose	3.25 (m), 3.41 (m), 3.48* (m), 3.74 (m), 3.79 (m), 3.84 (m), 3.89 (m), 3.91 (m), 4.65 (d), 4.8 (s), 5.24 (d)
24	Glycine	3.57* (s)
25	Lactate	1.33 (d), 4.12* (m)
26	Malic acid	2.66 (d), 2.69 (d), 4.29* (d), 4.31 (d)
27	6'-sialyllactose	1.75 (m), 1.92 (s), 2.04 (s), 2.72 (m), 3.32 (m), 3.53 (m), 3.8 (m), 4.44* (d), 4.69 (d), 5.24 (d)
28	Lacto-N-tetraose	2.04 (s), 2.14 (s), 3.3 (m), 3.77 (m), 4.17 (d), 4.46* (d), 4.67 (d), 5.24 (d)
29	N-acetylglucosamine	1.92 (s), 1.95 (s), 2.06 (s), 2.14 (m), 3.36 (s), 3.48 (m), 3.56 (m), 3.68 (m), 3.78 (m), 3.87 (m), 4.73 (d), 5.24* (d)
30	Galactose	4.59 (d), 5.27* (d)
31	2'-fucosyllactose	1.24 (d), 1.92 (s), 3.32 (m), 3.49 (m), 3.58 (m), 3.79 (m), 4.24 (m), 4.54 (d), 4.65 (d), 5.25 (d), 5.32* (s)
32	Fumarate	6.52* (s)
33	Tyrosine	3.068 (m), 3.20 (m), 3.95 (m), 6.91* (d), 7.20 (d)
34	Phenylalanine	3.14 (m), 3.28 (m), 4 (m), 7.38 (m), 7.43* (m)
35	Tryptophane	7.2 (d), 7.28 (m), 7.3 (s), 7.55 (d), 7.74* (d)
36	Formate	8.46* (s)

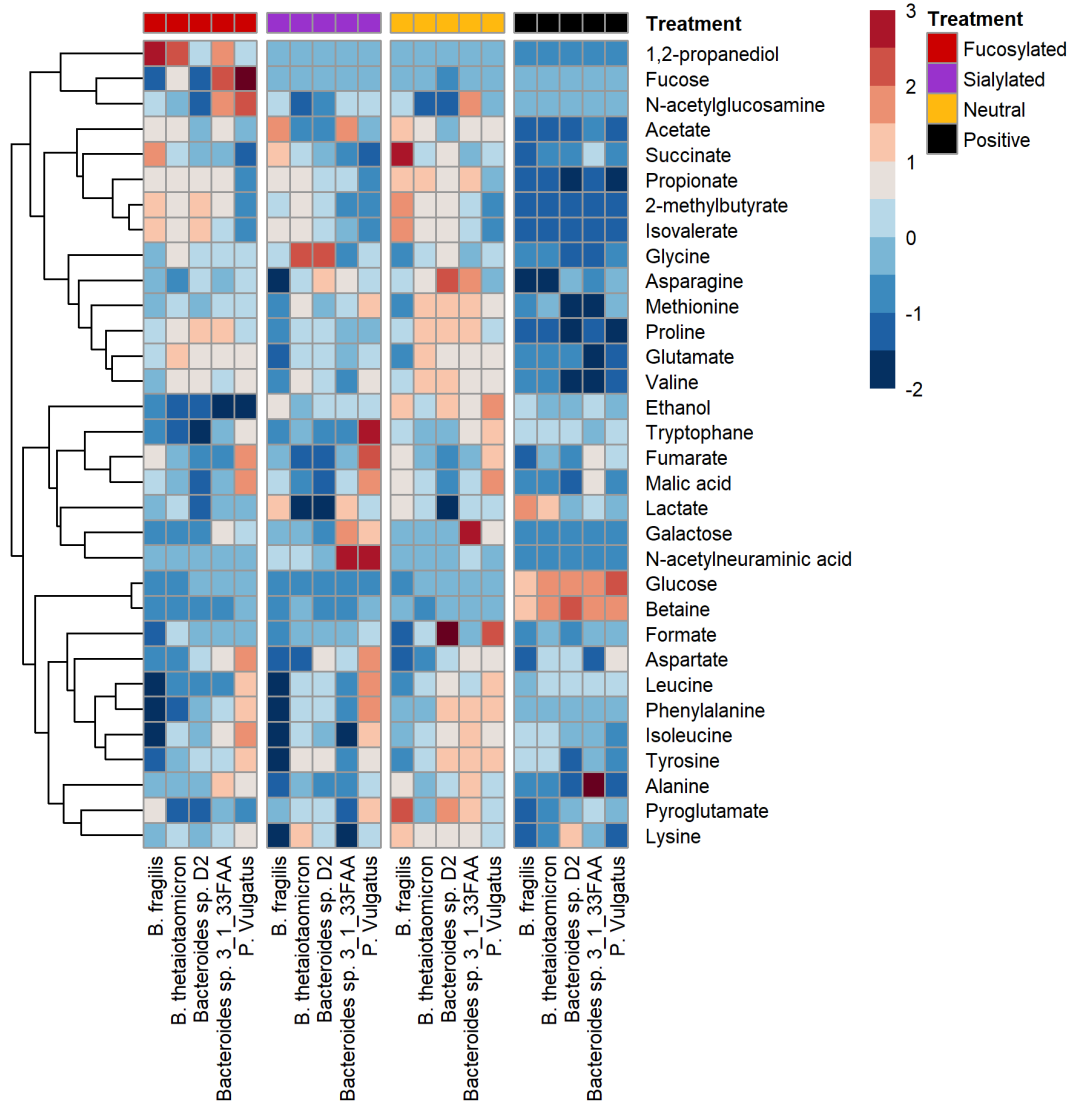
\*: Indicates the peak used for quantification based on the corresponding bucket intensity (not overlapping with peaks from other metabolites). Multiplicity of signals is indicated within brackets: s, singlet; d, doublet and m, multiplet



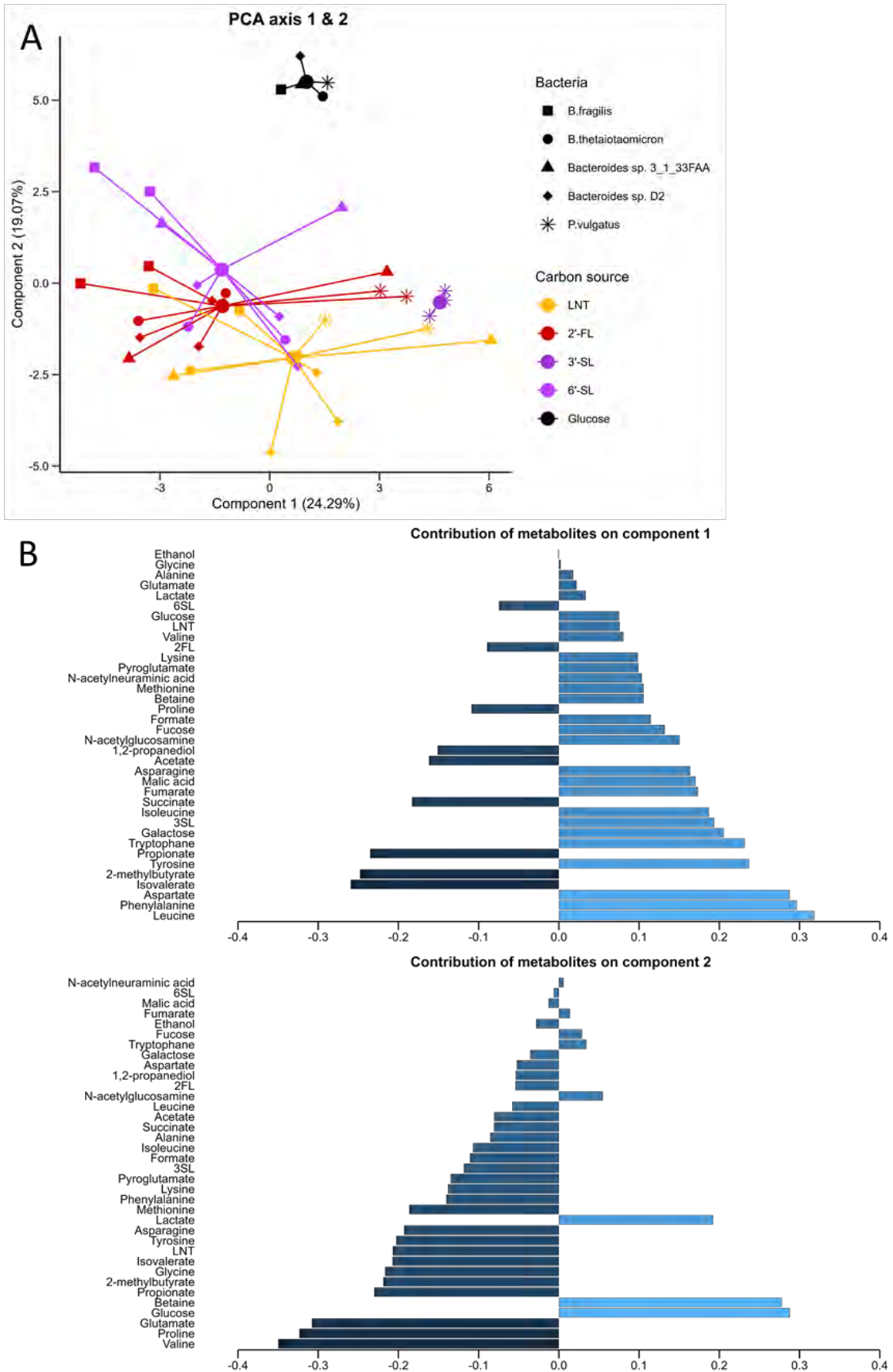
Supplementary Figure 1: In vitro short chain fatty acids and branched chain fatty acids production from (A) *B. fragilis* (B) *B. thetaiotaomicron* (C) *Bacteroides* sp. D2 (D) *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA (E) *H. hathewayi* (F) *B. uniformis* (G) *P. vulgatus* (H) *L. mucosae* (I) *L. amylovorus* cultivated in semi-defined media (mYCFa or mMRS) supplemented with 0.5% glucose (positive control), lacto-N-Tetraose (LNT), 2'-fucosyllactose (2'-FL), 3'-sialyllactose (3'-SL) or 6'-sialyllactose (6'-SL) or no carbon source (negative control). The concentrations were measured during the stationary phase. Values were calculated by subtracting the values from semi-defined media without bacterial strains. Data are presented as absolute concentration; histograms represent mean values and dots represent the values of each replicate (n = 2 or 3).



Supplementary Figure 2: In vitro SCFA production by (A) *H. hathewayi* (B) *B. uniformis* (C) *L. mucosae* (D) *L. amylovorus* cultivated in semi-defined media (mYCFa or mMRS) supplemented with 0.5% lacto-N-Tetraose (LNT), 2'-fucosyllactose (2'-FL), 3'-sialyllactose (3'-SL) or 6'-sialyllactose (6'-SL). The concentrations were measured during the stationary phase. Values were calculated by subtracting the values from semi-defined media without bacterial strains. Data are expressed relative to the concentrations measured in the positive control, histograms represent mean values and dots represent values of each replicate ( $n = 2$  or  $3$ ).



Supplementary Figure 3: Metabolome profiles in bacterial supernatants from isolated bacteria cultivated with glucose or neutral lacto-N-Tetraose (LNT), fucosylated 2'-fucosyllactose (2'-FL) or sialylated 3'-sialyllactose (3'-SL)/6'-sialyllactose (6'-SL) as carbon source. Heatmap representing the mean relative concentration of metabolites (rows) from isolated bacteria cultivated with glucose or MOs as carbon source (columns) in bacterial supernatant. The colors represent the Z-scores (row-scaled relative expression) from low (blue) to high values (red).



Supplementary Figure 4: Nuclear magnetic resonance-based metabolomics during the stationary phase in supernatants of *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides sp. D2*, *Bacteroides sp. 3\_1\_33FAA* and *Phocaeicola vulgatus* cultivated in semi-defined media (mYCFA) supplemented with 0.5% glucose (positive control), LNT, 2'-FL, 3'-SL or 6'-SL. (A) Principal component analysis (PCA) plot built with the relative abundance of each metabolite. (B) Loadings of the first and second component of the PCA. Each coordinate represents a single replicate of one bacterial species cultivated with a sole carbon source (MO or glucose) ( $n = 2$  or  $3$ ).

## Chapitre 3 Analyse des effets directs et indirects des oligosaccharides du lait sur la réponse immunitaire intestinale du lapereau

---

Le deuxième volet de l'étude sur la fonctionnalité des MOs *in vitro* porte sur leurs effets sur la réponse immunitaire intestinale. La majorité des travaux existants se fondent sur des modèles de lignées cellulaires ou sur des cellules immunitaires issues du sang périphérique (PBMCs), qui ne reflètent que partiellement les interactions ayant lieu au sein même de la muqueuse intestinale. Pour surmonter cette limitation, nous avons développé un modèle basé sur les cellules mononuclées de la *lamina propria* (LPMCs) du caecum de lapereau, afin de nous rapprocher des conditions physiologiques de l'intestin. L'utilisation d'un tel modèle nécessitait la mise au point préalable d'un protocole d'isolement et de culture robuste, celui-ci n'ayant jamais été établi pour les LPMCs caecales chez le lapereau. Nous avons également évalué des conditions de stimulation permettant d'induire une réponse immunitaire et inflammatoire des LPMCs. Ce modèle a permis d'évaluer la réponse des LPMCs tant en conditions basales que stimulées. Un travail parallèle de phénotypage des LPMCs, auquel je n'ai pas contribué, nous a permis de caractériser les types cellulaires en présence. Ce travail méthodologique a donc constitué une étape essentielle en amont de l'étude fonctionnelle des MOs, et fait l'objet de l'article 4. Les informations supplémentaires volumineuses sont accessibles via des documents annexes transmis dans un lien séparé. Elles incluent les expressions géniques des LPMCs selon les différentes conditions de culture.

Une fois le modèle fonctionnel établi, nous avons évalué les effets des MOs selon deux modalités, (i) un effet direct, en incubant les LPMCs avec les MOs, et (ii) un effet indirect, via l'action de métabolites issus de leur dégradation par des bactéries intestinales commensales. Ces deux volets ont été analysés à la fois en conditions basales, afin de déterminer si les MOs peuvent moduler la réponse immunitaire intestinale, et après stimulation pour analyser la capacité des MOs à atténuer, ou au contraire exacerber l'inflammation et la réponse immunitaire induite par les stimulants. Les MOs testés (Lacto-N-tetraose, 2'-fucosyllactose et 6'-sialyllactose) sont identiques à ceux utilisés dans l'étude précédente sur les interactions bactériennes. Grâce aux résultats obtenus dans cette première étude (Chapitre 2), nous avons pu identifier les métabolites d'intérêts produits lors de la croissance bactérienne en présence des MOs, et ainsi sélectionner ceux à tester sur les LPMCs. Nous nous sommes focalisés sur trois composés : l'isobutyrate, l'isovalérate (deux acides gras à chaînes ramifiées) et le 1,2-propanediol. Ces molécules, peu étudiées jusqu'à présent pour leurs effets immunitaires, ont été fortement produites lors de la dégradation des MOs, en particulier avec le 2'-FL pour l'isobutyrate et le 1,2-propanediol. Cette observation met en évidence un effet dépendant de la structure des MOs sur le métabolisme bactérien, justifiant leur sélection pour explorer l'hypothèse selon laquelle la structure des MOs influence la modulation immunitaire via les métabolites microbiens. Ce travail fait l'objet de l'article 5. Les informations supplémentaires volumineuses sont accessibles via des documents annexes transmis dans un lien séparé. Elles incluent les expressions géniques des LPMCs selon les différentes conditions de culture.

**Article 4 : Méthode d'isolement, de culture et de stimulation des cellules mononuclées de la lamina propria du lapin (LPMCs)****Article en préparation**

Mathilde Rumeau, Corinne Lencina, Norah Fabre, Laurent Cauquil, Lise Gallo, Cedric Cabau, Frederic Martins, Alexia Zakaroff-Girard, Elodie Riant, Sylvie Combes et Christelle Knudsen

Résumé : La *lamina propria*, qui se trouve sous l'épithélium, est le principal compartiment des cellules immunitaires de la muqueuse intestinale. Disposer d'un accès fiable à ces cellules est nécessaire pour comprendre la réponse immunitaire intestinale. Bien que des méthodes aient été développées pour les échantillons d'humains et de rongeurs, l'isolement et la culture de ces cellules chez le lapin n'ont pas encore été décrits. Nous présentons ici le premier protocole détaillé pour l'isolement, la caractérisation et la culture des cellules mononuclées de la *lamina propria* (LPMCs) de lapin. Ce protocole comprend deux digestions chimiques, suivies d'une digestion enzymatique et d'une purification par gradient de densité. Notre méthode d'isolement permet d'obtenir des cellules viables et adaptées à des applications telles que la culture *in vitro* et le phénotypage cellulaire. Des analyses par cytométrie de flux et par séquençage de l'ARN de cellules uniques nous ont permis d'identifier et de quantifier les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules T et B ainsi que les cellules natural killer (NK). *In vitro*, nous avons également évalué la viabilité et le maintien du phénotype des cellules en culture pendant 24 heures. Nos résultats démontrent que, si la viabilité des cellules est maintenue, leur phénotype subit tout de même des changements notables. Enfin, nous proposons deux méthodes de stimulation des LPMCs isolées, avec le stimulant lipopolysaccharides (LPS) ou le stimulant phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA)-ionomycine pour des tests immunitaires fonctionnels. Le LPS a effectivement déclenché une réponse inflammatoire, tandis que la PMA-ionomycine a activé les lymphocytes T. Ce travail fournit un outil fondamental pour l'étude de l'immunité des muqueuses chez le lapin, tant *in vivo* grâce au phénotypage fin des cellules immunitaires intestinales, qu'*in vitro* grâce à leur culture en présence de composés bioactifs d'intérêt.

## An isolation, culture and stimulation method of rabbit cecal *lamina propria* mononuclear cells (LPMCs)

Mathilde Rumeau<sup>1</sup>, Corinne Lencina<sup>1</sup>, Norah Fabre<sup>1</sup>, Laurent Cauquil<sup>1</sup>, Lise Gallo<sup>1</sup>, Cedric Cabau<sup>1</sup>, Frederic Martins<sup>2,3</sup>, Alexia Zakaroff-Girard<sup>2,4</sup>, Elodie Riant<sup>2,4</sup>, Sylvie Combes<sup>1</sup> and Christelle Knudsen<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> *GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, 31326 Castanet-Tolosan, France ;*

<sup>2</sup> *Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), INSERM UMR 1297, 31432 Toulouse, France ;*

<sup>3</sup> *Plateforme GeT ; Genotoul, 31100 Toulouse ; France ;*

<sup>4</sup> *Plateforme Cytometry TRI-FBI, Genotoul, 31100 Toulouse, France.*

\*Corresponding author: [christelle.knudsen@inrae.fr](mailto:christelle.knudsen@inrae.fr)

### Abstract

The *lamina propria*, underlying the epithelium, is the main immune cell compartment of the gut mucosa. Reliable access to these cells is necessary for understanding the immune response within the gut. Although methods are available for human and rodent samples, their isolation and culture in rabbits remain undescribed. Here, we present the first detailed protocol for the isolation, characterization and culture of rabbit cecal *lamina propria* mononuclear cells (LPMCs). This protocol includes two chemical digestions followed by an enzymatic digestion and a purification on a density gradient. Our isolation method yields viable cells suitable for downstream applications such as *in vitro* culture and cell phenotyping. Flow cytometry and single-cell RNA-sequencing analyses enabled us to identify and quantify macrophages, dendritic cells, T and B cells, and natural killer (NK) cells. *In vitro*, we additionally evaluated viability and phenotype maintenance of the cells in culture over 24 h. Our results demonstrate that although cell viability is maintained, notable changes occur in their phenotype. Finally, we propose two stimulation methods of the isolated LPMCs with lipopolysaccharides (LPS) and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-ionomycin for functional immune assays. LPS effectively triggered an inflammatory response, whereas PMA-ionomycin activated T lymphocytes. This work provides a founding tool for investigating mucosal immunity in rabbits, both *in vivo*, through the fine phenotyping of gut immune cells, and *in vitro*, through their culture in the presence of bioactive compounds of interest.

### Introduction

The intestinal immune system - especially the gut-associated lymphoid tissue (GALT) – plays a central role in host defense and immune balance (Arrazuria et al., 2018). Among the primary immune compartments in the gut, the *lamina propria*, underlying the epithelium in the intestinal mucosa, is considered the primary effector site of the intestinal immune response and is composed of a heterogeneous immune cell population (Wittig and Zeitz, 2003; MacDonald, 2008). Despite their immunological and functional relevance, the diversity and

phenotype of these cells has, however, been poorly characterized in rabbits (Haines et al., 2016). *Lamina propria* cells include many cell types such as polynuclear and mononuclear immune cells, fibroblasts, endothelial cells (Powell et al., 2011). The LPMCs isolation process yield mononuclear cells but also a proportion of non-hematopoietic stromal cells, including fibroblasts, however, polynuclear immune cells are systematically excluded (Benmeziene et al., 2022). Although protocols for isolating LPMCs from the intestine have been described in murine, human and non-human primate species (Weigmann et al., 2007; Benmeziene et al., 2022; Kim et al., 2022), none have been adapted or validated for rabbits.

To date, *in vitro* functional studies of the rabbit immune response have mostly relied on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) or cells from secondary lymphoid organs such as peripheral lymph node, Peyer patches, the appendix or the spleen (Sheppard et al., 1976; Laybourn et al., 1990; Jacquier et al., 2015; Haines et al., 2016). However, PBMCs, spleen or lymph node-derived cells do not accurately reflect the intestinal immune environment, while models such as intraepithelial lymphocytes (IELs), isolated from Peyer's patches or the appendix, only partially capture the complexity of the *lamina propria* immune network. Namely, several studies have reported substantial phenotypic and functional differences between humans PBMCs and LPMCs, particularly in terms of activation status, receptor expression and cytokine responses (Burke Schinkel et al., 2024), supporting the need to develop a dedicated culture model for intestinal LPMCs. In order to induce an immune and/or inflammatory response *in vitro* a stimulation is necessary (Ai et al., 2013). Two main methods are frequently used, nonspecific mitogens or antibodies. In a mixture of cells, antibody stimulations are not suitable since they target specific immune cell types (Lawlor et al., 2021).

Our work enabled us to design a protocol for the isolation and culture of LPMCs in rabbits, allowing for downstream functional analyses, through (i) the successful isolation of high levels of live LPMCs covering the cellular diversity of the gut immune cells, (ii) the successful culture of viable cells and the evaluation of their *in vitro* phenotype, (iii) the validation of two *in vitro* immune stimulation methods of the cells, namely the inflammatory bacterial component LPS, used to primarily activate innate immune pathways and the mitogen PMA-ionomycin to broadly stimulate lymphocytes (Truneh et al., 1985; Ciesielska et al., 2021).

### Material and methods

The LPMC isolation and culture protocol described in this article is published on protocols.io.

#### **Animals**

Suckling rabbits (20-27 days of age) raised at the IE GenPhySE Sheep and rabbit experimental facility (<https://doi.org/10.17180/ftvh-x393>) were used for cecal LPMC isolation. The rabbits were killed by electronarcosis followed by an exsanguination. Ceca were carefully dissected, stored full in cold PBS, and processed within 10 minutes after collection. All animal handling was conducted in accordance with the current ethical standards of the European Community (Directive 2010/63/EU), and the French legislation on animal experimentation and ethics. The experiment received the approval of the local ethics committee: Ethical committee in animal experimentation (CEEA) "Science et santé animales CEEA-115". The approval is registered

under the reference number SSA 2024 006V2. Details about the sampled individuals, including age, body weight and cecum sample weight are provided in Table S1.

### Isolation of rabbit *lamina propria* mononuclear cells (LPMCs)

Cecal LPMCs were isolated according to a protocol adapted from that described by Weigmann et al. (2007) (Figure 1). The cecum was dissected to remove fat and fecal content and cut into 1 cm<sup>2</sup> pieces to favor chemical lysis. Epithelial cells were removed by chemical digestion in Hank's balanced salt solution (HBSS without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>) supplemented with 5 mM of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Invitrogen, Waltham, Massachusetts, United States) and 1 mM of Dithiotreitol (DTT; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, United States), incubated twice for 20 minutes at 37°C under slow rotation (40 g), and filtered out by passing the digestion solution through a 100 µm cell strainer. The tissue was rinsed twice in PBS at 37°C. Mononuclear cells were then recovered after enzymatic digestion of the *lamina propria* in phosphate buffered saline 1X (PBS; Gibco, Grand Island, New York, United States) supplemented with 0.12 U/ml of Collagenase D (Roche diagnostics, Meylan, France), 1 480 U/ml of DNase I (Roche diagnostics) and 2 U/ml of dispase II (Roche diagnostics), incubated once (rabbits number 1 to 28) or twice (rabbit number 29 for scRNA sequencing, Table S1) for 20 minutes at 37°C under slow rotation (40 g), and filtered by passing the digestion solution through a 40 µm cell strainer. The flowthrough was retrieved, enzymes were removed and cells were rinsed by addition of cold PBS with 3% FBS (Fetal Bovin Serum, Gibco, Grand Island, New York, United States) followed by a 10 min centrifugation at 500 g. LPMCs were then resuspended and isolated in a 40/80 % Percoll density gradient (Percoll®; Sigma-Aldrich) centrifuged for 15 minutes at 1000 g without breaks. The cells at the density interface were harvested, rinsed in PBS with 3% FBS, and centrifuged at 500 g for 5 minutes. The cell pellet was then resuspended in PBS with 3% FBS and LPMCs were counted with an automated cell counter (Countess 3; Invitrogen).

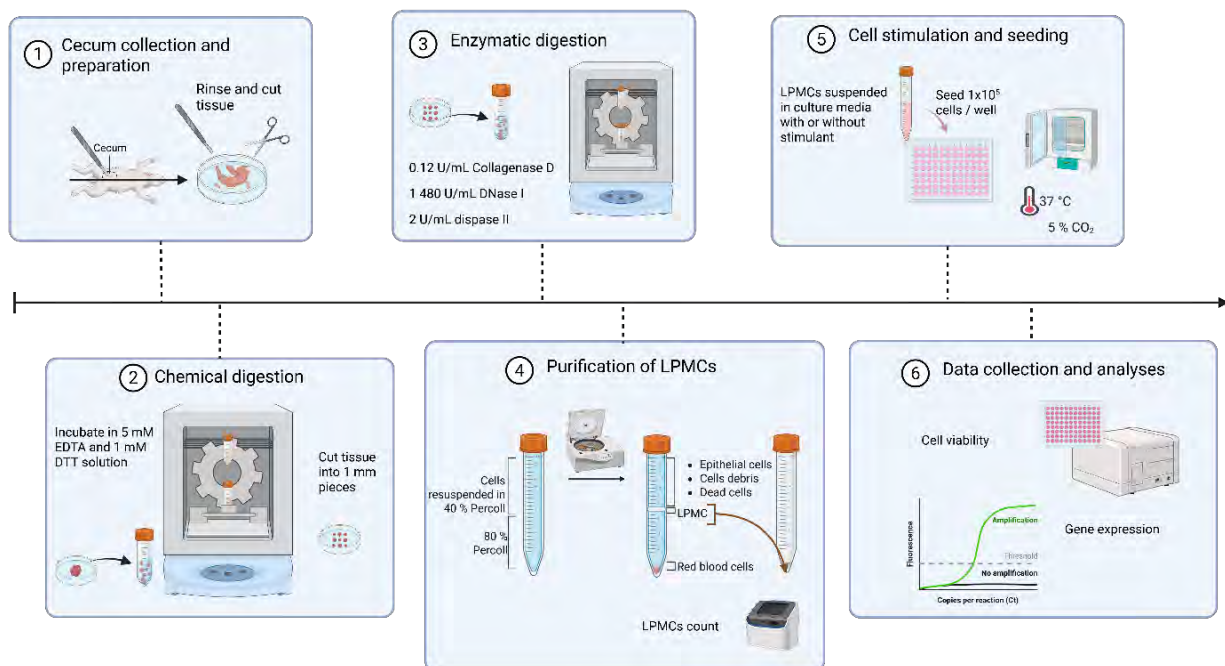


Figure 1: Main steps required to isolate and culture rabbit cecal lamina propria mononuclear cells (LPMCs). Created with BioRender.

## Culture and stimulation of the isolated LPMCs

Isolated cells were cultured at  $1 \times 10^6$  cells/mL in IMDM GlutaMAX (Gibco) supplemented with 10% FBS (Gibco), 50  $\mu$ M of 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) and 6  $\mu$ g/ml gentamycin (Sigma-Aldrich). The LPMCs were seeded in flat bottom 96 well plates (Greiner Bio One Bioscience, Frickenhausen, Germany) at a density of  $1 \times 10^5$  cells/well. The cells were left unstimulated (basal) or in the presence (stimulated) of Phorbol-12-myristate-13-acetate with ionomycin (experiments 1 and 2) and/or LPS (experiments 1 and 3).

### *Experiment 1: Evaluation of the dose dependent effects of the stimulants*

LPMCs (n = 3 samples) were left unstimulated (control) or in the presence (stimulated) of 5, 10 or 25  $\mu$ g/ml of Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA; Sigma-Aldrich) and 1  $\mu$ g/mL of ionomycin (Sigma-Aldrich) or 1, 5 or 10  $\mu$ g/ml of LPS (E.Coli O111 :B4; Sigma-Aldrich) and incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> during 24 hours in order to evaluate potential dose dependent cytotoxic effects of the stimulants.

### *Experiment 2: Evaluation of the stimulation with PMA-ionomycin*

LPMCs (n = 10 samples) were left unstimulated (control) or in the presence (stimulated) of 5  $\mu$ g/ml of Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA; Sigma-Aldrich) and 1  $\mu$ g/mL of ionomycin (Sigma-Aldrich) and incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. After 4 and 24 hours, cell media was removed and cells were collected and lysed in Qiagen RLT buffer (RNeasy plus micro kit; Qiagen) and loaded onto QIAshredder homogenizer columns (QIAshredder; Qiagen) before storage at -80°C until RNA purification. Cells before culture (timepoint zero) were also collected and submitted to the same RNA extraction procedure.

### *Experiment 3: Evaluation of the stimulation with LPS*

LPMCs (n = 14 samples) were left unstimulated (control) or in the presence (stimulated) of 1  $\mu$ g/ml of LPS (E.Coli O111 :B4; Sigma-Aldrich) to stimulate immune and inflammatory responses, and incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. After 4 and 24 hours, cell media was removed and cells were collected and lysed in Qiagen RLT buffer (RNeasy plus micro kit; Qiagen, Hilden, Germany) and loaded onto QIAshredder homogenizer columns (QIAshredder; Qiagen) before storage at -80°C until RNA purification. Cells before culture (timepoint zero) were also collected and submitted to the same RNA extraction procedure.

## Phenotyping of the isolated and cultivated LPMCs

### *Flow cytometry, cell sorting and single-cell RNA-sequencing preparation*

Cells from a 27 days old rabbit (rabbit number 29, Table S1) were used to fine phenotype the isolated cells using flow cytometry and single-cell RNA-sequencing. After LPMC isolation and purification, in order to sort dead cells out, cells were first stained with the LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (ThermoFisher Scientific) for 30 min on ice protected from light. Cells were washed in PBS with 3% SVF three times. Cells were then stained with a primary Mouse anti rabbit CD45 antibody (Biorad), enabling to stain all hematopoietic cells, for 30 min on ice protected from light according to the manufacturer's instructions. Finally, cells were washed in PBS with 3% SVF and stained with a human antimouse IgG1:DyLight®650 antibody

(Biorad) for 30 min on ice protected from light according to the manufacturer's instructions. Cells were washed once in PBS with 3% SVF and filtered on a 40  $\mu$ M strainer before sorting live CD45<sup>+</sup> cells with a BD Influx cell sorter instrument at the I2MC Cytometry and Cell sorting TRI platform (Toulouse, France).

#### *Single cell RNA-sequencing*

Approximately 10 000 cells were used for encapsulation into droplets using Chromium Next GEM Single-cell 3' Reagent Kits v3.1 according to manufacturer's instructions (10x Genomics). After generation of Gel bead-in-EMulsions (GEMs), GEMs were reverse transcribed using a C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad). Then, single-cell droplets were broken and cDNA was isolated and purified with Cleanup Mix containing DynaBeads (ThermoFisher Scientific). cDNA was later amplified with a C1000 Touch Thermal Cycler and approximately 250 ng of amplified cDNA was fragmented, end-repaired, A-tailed, index adaptor ligated, and cleaned with cleanup mix containing SPRIselect Reagent Kit (Beckman Coulter) in between steps. Post-ligation product was amplified and indexed with a C1000 Touch Thermal Cycler. The sequencing-ready libraries were cleaned up with SPRIselect beads. The 10x library was loaded with 1% PhiX on one SP lane of the NovaSeq 6000 instrument (Illumina).

#### *Viability and cellular proliferation measurements*

Cell viability was assessed in duplicate or triplicate, at 0, 4 (experiments 2 and 3) and 24 hours (experiments 1, 2 and 3), with a luminescence method with the CellTiter-glo Reagent<sup>®</sup>. The kit lyses cells leading to adenosine triphosphate (ATP) release by live cells which then reacts with luciferin to emit a light signal proportional to the ATP content. Briefly, 100  $\mu$ l of CellTiter-glo Reagent<sup>®</sup> were added in each well, the plate was shaken for 2 minutes on an orbital plate shaker to induce cell lysis and incubated for 10 minutes at room temperature to stabilize the luminescence. Luminescence was measured for one second per well with a multimode plate reader (Infinite 200 PRO Tecan, Männedorf, Switzerland). The results obtained were first normalized to the culture media and then to cell culture timepoint zero,  $1 \times 10^5$  cells/well.

#### *mRNA purification, cDNA synthesis and gene expression analysis*

RNA was purified with the RNeasy plus micro kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. After an initial homogenization of samples in lysis buffer, a binding of genomic DNA to a gDNA Eliminator spin column was realized to remove contaminating genomic DNA. The flow-through, containing RNA, was then mixed with ethanol and transferred to a silica-membrane spin column to bind RNA. After elution in RNase-free water, the concentration and purity of the extracted RNA were assessed using a NanoDrop spectrophotometer (Nanodrop 8000; ThermoFisher Scientific). When possible, the concentration was adjusted to a final concentration of 20 ng/ $\mu$ l and cDNA was synthesized using the QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. RNA samples were first incubated with a gDNA wipeout Buffer to degrade residual genomic DNA. After heat inactivation, reverse transcription was performed. cDNA were stored at -20°C until further analysis. Gene expression evaluation was conducted by the GENTYANE platform (UMR GDEC INRAE/UCA, Clermont-Ferrand, France) using the Biomark<sup>™</sup> X system (Standard Biotech). The sequences of the primers are presented in Table S2. The obtained qPCR data were visualized

using Standard Biotoools Real-Time PCR Analysis Software. Quality controls included the assessment of PCR efficiency using standard curves, melt curve analysis to confirm the specificity of PCR (single PCR product), and the use of no-template controls to ensure the absence of non-specific amplification. The mRNA expression levels of each targeted genes were analyzed with the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. Gene expression was first normalized to the geometric mean of the stably expressed genes ATP5B and PGK1 for experiment 2 at 4 and 24 h of culture and experiment 3 at 4 h of culture and to the stably expressed genes B2M and PGK1 for experiment 3 at 24 h of culture. To evaluate the phenotype of basal LPMCs in culture, the calibrator used to normalize the  $\Delta Ct$  expression was the gene expression at timepoint 0 per individual. To evaluate stimulation effects within defined stimulation contexts, expression levels were normalized intra-individual to the expression level of basal samples at 4 and 24 h.

## Data analyses

### *Bioinformatic single-cell RNA-sequencing analyses*

Cell Ranger Software (10x Genomics) was used to align and quantify raw sequencing data using the rabbit reference genome (OryCun 2.0). 158 million reads were obtained among which 89 % were mapped to the reference genome.

### *Statistical analyses*

All data analyses were performed using the R software (v-4.3.2). The relationship between cecum weight (g) and cell yield (total cell number) in the 3 experiments was evaluated using Pearson's correlations. Scatterplots with fitted linear regression lines and 95 % confidence intervals were generated to visualize the relationship between variables. In order to evaluate the phenotype of the cultivated cells over time, viability and log transformed  $2^{-\Delta Ct}$  gene expression data in all basal LPMCs (samples from experiments 1, 2 and 3 for viability and experiments 2 and 3 for gene expressions) were analyzed with a general linear mixed model using the lmer function with time as a fixed effect and the rabbit as random effect (R packages car, lme4, emmeans) (Bates et al., 2015; Fox et al., 2024; Lenth et al., 2025). Different timepoints (T0, T4 and T24) were compared pairwise with the Tukey post-hoc test.  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  gene expression data normalized to timepoint 0 without log transformation were used for graphical representations.

In experiment 1, the effect of doses of stimulants on viability after 24 h of culture were examined using the Kruskal-Wallis test, followed by a Wilcoxon test to compare the doses pairwise. In order to evaluate the stimulation methods in experiments 2 and 3, viability and log transformed  $2^{-\Delta Ct}$  gene expression data were analyzed at each timepoint (T4 or T24) with a general linear mixed model using the lmer function with treatment (control or stimulated, PMA-ionomycin in experiment 2 and LPS in experiment 3) as a fixed effect and the rabbit as random effect (R packages car, lme4, emmeans) (Bates et al., 2015; Fox et al., 2024; Lenth et al., 2025).  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  gene expression data normalized to the respective control (T4 or T24) without log transformation were used for graphical representations.

The Seurat pipeline was used for single-cell RNA sequencing data preprocessing and analysis. Only cells with more than 500 expressed genes, between 500 and 20 000 counts and with a

percentage of mitochondrial RNA below 15% were kept. The resulting data were normalized via the `NormalizeData` function of Seurat, with the `LogNormalize` method. The top 3,000 variable features were then extracted. After scaling data to unit variance, dimensionality reduction was carried out with Principal Components Analysis (50 PCs). Cell clustering was performed based on retained PCs with a resolution of 0.3. Finally, clusters were visualized using the non-linear reduction dimensionality Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) performed on PCA reduction (30 PCs). Cell types were then manually assigned based on well-known cell type markers.

## Results

### Isolation of LPMC

#### *Cell yield from cecal LPMC isolation*

On average we isolated  $16.4 \times 10^6 \pm 8.9 \times 10^6$  LPMCs per rabbit corresponding to  $5.1 \times 10^6 \pm 3.1 \times 10^6$  per g of cecum (Figure 2 and Table S1). However, the number of cells obtained varied substantially between individuals, ranging from  $5 \times 10^5$  to  $13 \times 10^6$  cells per g of cecum and no correlation between the number of cells and the sampled tissue weight was evidenced (Figure 2).

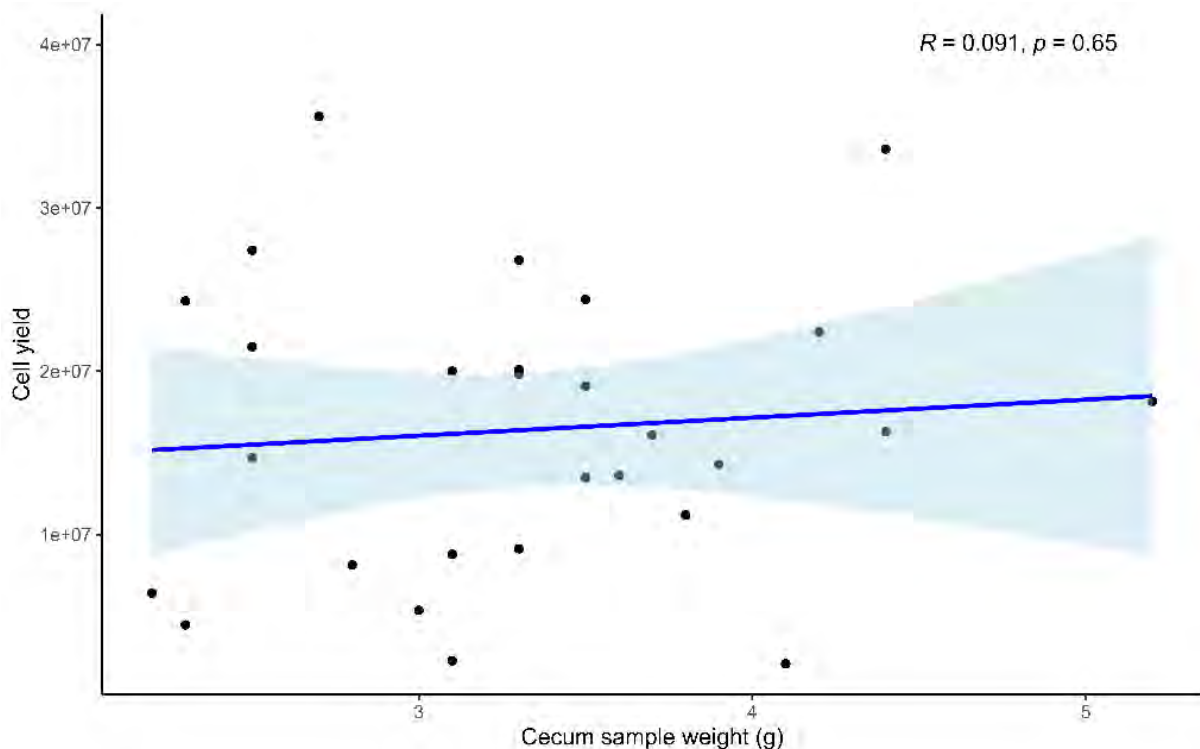


Figure 2: Isolated lamina propria mononuclear cell (LPMC) yields according to cecal tissue weight. Cells were counted with an automated counter ( $n = 28$  rabbits).

#### *Isolated cell phenotyping*

Flow cytometry data obtained on a rabbit show that 93% of the LPMCs are live single cells and 16% are CD45<sup>+</sup>. Single cell RNA sequencing was performed on these cells. After applying quality filters, 4 064 cells were kept and the expression of 12 086 genes was detected. Based on the expression of canonical markers, 12 cell clusters were identified. The majority of the

mononuclear immune cell identified in the *lamina propria* belonged to macrophages, dendritic cells, T and B lymphocytes, in order of abundance (Figure 3).

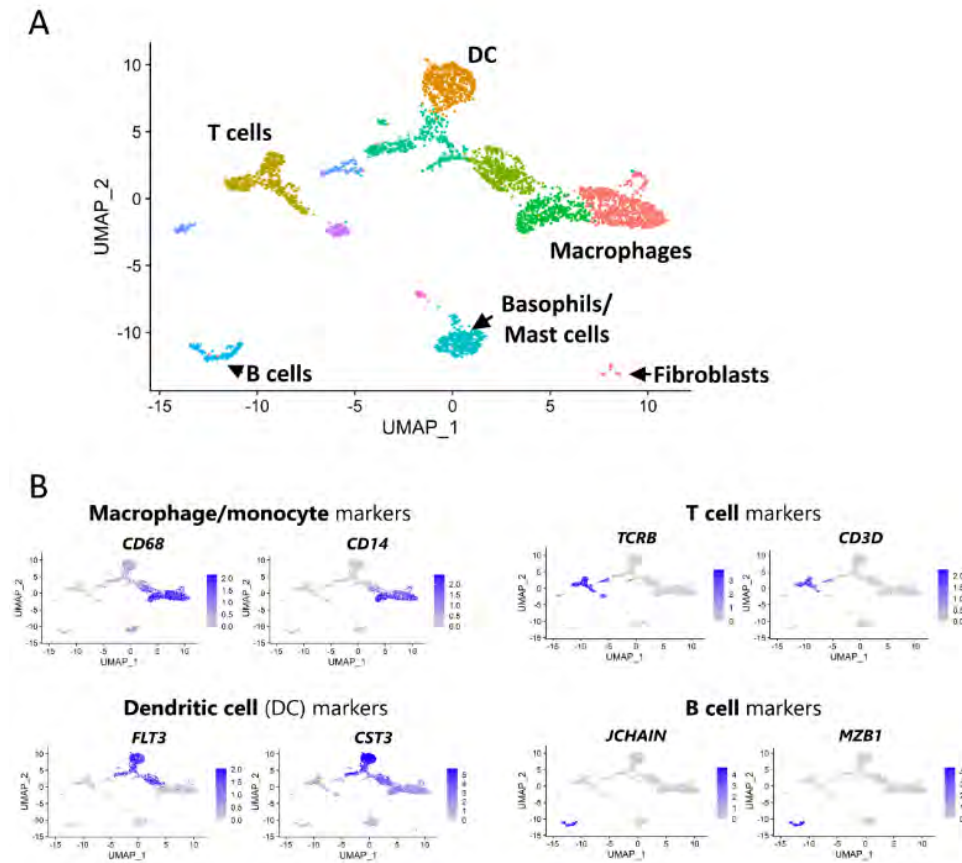


Figure 3: Single cell transcriptomic profile of isolated live CD45<sup>+</sup> LPMCs in the rabbit cecum. (A) Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) of cells colored by cluster. Each dot represents a cell. (B) UMAPs colored by the expression level of selected marker genes of the main cell types.

Our protocol proved to be functional in isolating a viable number of LPMCs, which are representative of the main immune cell types expected *in vivo*.

### ***In vitro* culture of LPMCs**

Viability and proliferation of the LPMCs was assessed after 4 and 24 h of culture (Figure 4) and the number of viable cells increased with the incubation time ( $p$ -value < 0.001), demonstrating their ability to proliferate *in vitro* under the chosen culture conditions.

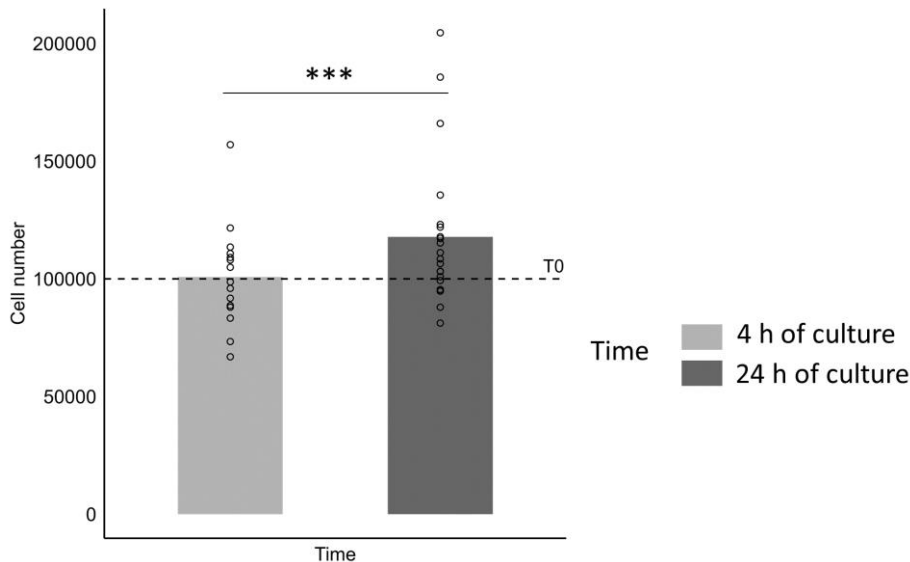


Figure 4: Cell viability over time of LPMCs without any stimulation ( $n = 27$  rabbits).

To assess if the LPMCs kept their original phenotype (timepoint 0) during culture, we evaluated the expression of 49 genes related to main immune functions over time (Table S3). Culture of the cells led to marked modulation of immune-related genes, with 98 % of the genes modulated by time. Regarding inflammation-related genes, expression of CXCL8 was significantly upregulated after 4 h (3-fold higher) with a stronger induction at 24 h (11-fold higher) (Figure 5A). Conversely, TNF expression was downregulated at both timepoints (6 and 5-fold lower, respectively), as were the expression of several other cytokines, IL13 and IL18 were downregulated at 4 h (29 and 3-fold lower, respectively) and this reduction increased after 24 h (77 and 6-fold lower) (Figure 5A). S100A8 and S100A9 expression, known damage-associated molecular patterns (DAMPs), were also induced, particularly after 24 h of culture (6 and 6.2-fold higher, respectively) (Figure 5A). The expression of the chemokine CCL2 was significantly upregulated after 24 h of culture (5-fold higher compared to timepoint 0), whereas CCL20 expression was significantly downregulated after both 4 and 24 h (5 and 6.5-fold lower, respectively) (Figure 5B). A similar pattern was observed for the chemokine receptor CCR5, whose expression dropped sharply after 4 h (26-fold lower) which was corrected after 24 h (1.8-fold lower) (Figure 5B). JCHAIN expression, essential for IgA and IgM polymerization, was markedly reduced over time (10.5 and 35-fold lower) (Figure 5C). Some genes, such as TNFSF13 and TNFSF13B, were initially downregulated at 4 h (2.9 and 7.4-fold lower, respectively) with TNFSF13B partially recovering by 24 h (1.7-fold lower), suggesting dynamic regulation over time (Figure 5C).

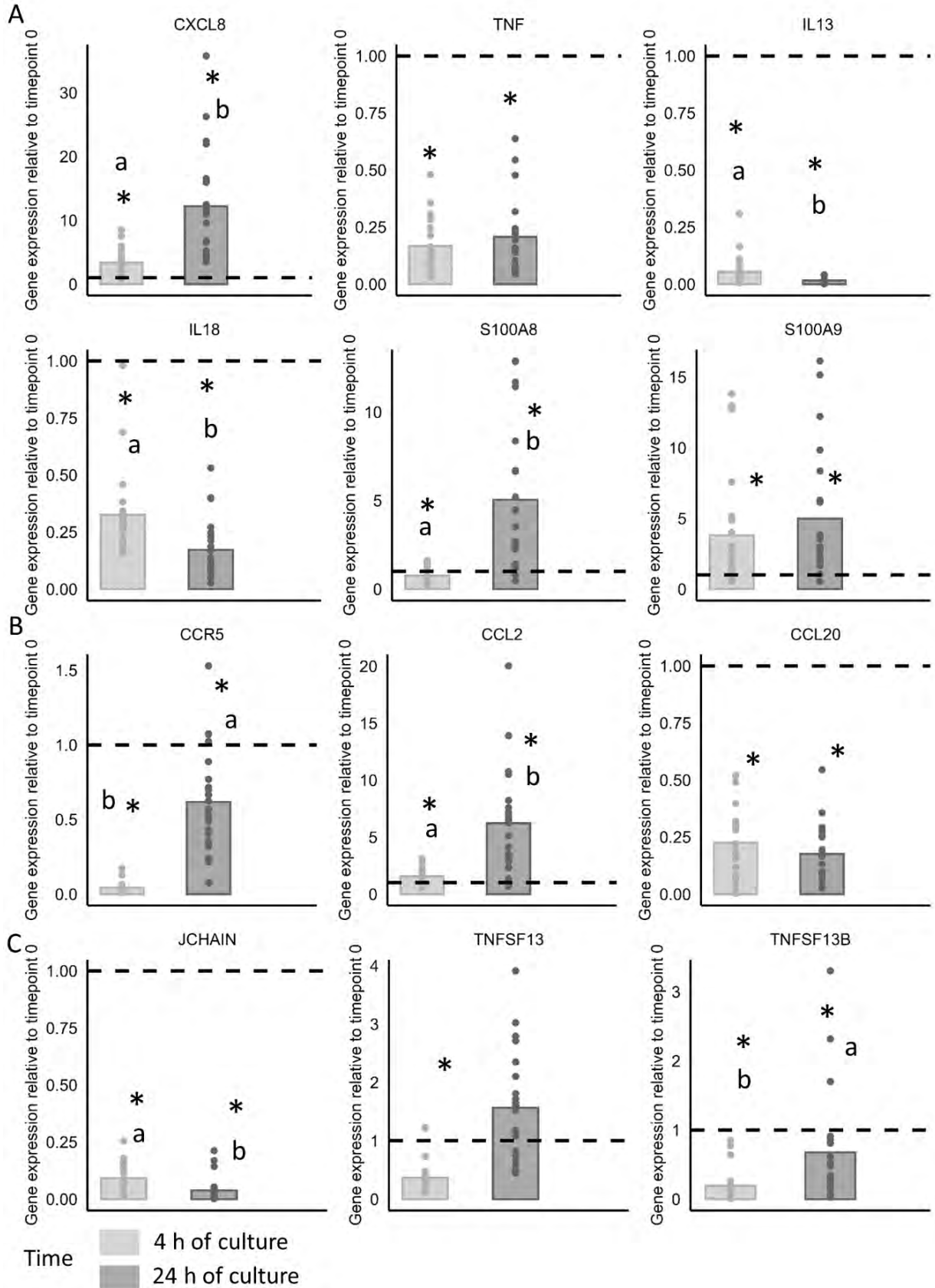


Figure 5: Relative expression of genes coding for (A) pro-inflammatory cytokines and proteins, (B) chemotaxis, (C) humoral immunity in rabbit cecal LPMCs in culture for 4 and 24 h ( $n = 24$  rabbits). Gene expression data are normalized to timepoint 0 (baseline) without log transformation. Mean values with a different superscript differ ( $p < 0.05$ ), \* significantly different from timepoint 0 ( $p < 0.05$ ).

Genes related to integrins and cell adhesion were also downregulated during culture. ITGAM and ITGAX were weakly reduced at 4 h (4.4 and 1.3-fold lower). Interestingly, while ITGAM expression slightly increased after 24 h, still being significantly lower than at timepoint 0 (1.7-fold lower), the expression of ITGAX was upregulated after 24 h (5.6-fold higher), suggesting a possible late compensatory mechanism (Figure 6A). PTPRC expression, marker of CD45<sup>+</sup> cells, was downregulated at both 4 and 24 h, but increased between 4 and 24 h, suggesting a regain of proliferation of CD45<sup>+</sup> cells at that timepoint (5.8 and 3.2-fold lower at 4 and 24 h) (Figure 6A). Markers related to immune cell activation and co-stimulation were consistently downregulated over time. CD14 expression decreased significantly after 4 h of culture (5.3-fold lower) and CD69 expression dropped after 4 h and substantially after 24 h of culture suggesting a progressive loss during culture (9 and 36-fold lower, respectively) (Figure 6A). Modulation of innate immune sensing pathways was also evident, TLR5 expression exhibited a strong suppression at 24 h (3.4-fold lower at 4 h and 10-fold lower at 24 h) (Figure 6A). FLT3 expression was significantly downregulated after 4 h (9.2-fold lower) which was moderately persisting at 24 h (1.3-fold lower). The expression of the transcription factor FOXP3, associated with regulatory T cells, was significantly reduced at both timepoints (2.8 and 4-fold lower, respectively), while the expression of the proliferation marker MKI67 increased significantly over time (1.5 and 5-fold higher at 4 and 24 h) (Figure 6B). The galectin LGALS9 expression showed a reversal with a downregulation at 4 h (2.8-fold lower) followed by an upregulation after 24 h (2.9-fold higher) (Figure 6B). CST3 expression, associated with apoptosis regulation, was significantly reduced after 4 h of culture and more strongly after 24 h of culture (1.3 and 7.5-fold lower, respectively). Similarly, ITGA1 showed an important decrease in expression at both timepoints (71 and 86-fold lower, respectively) (Figure 6C).

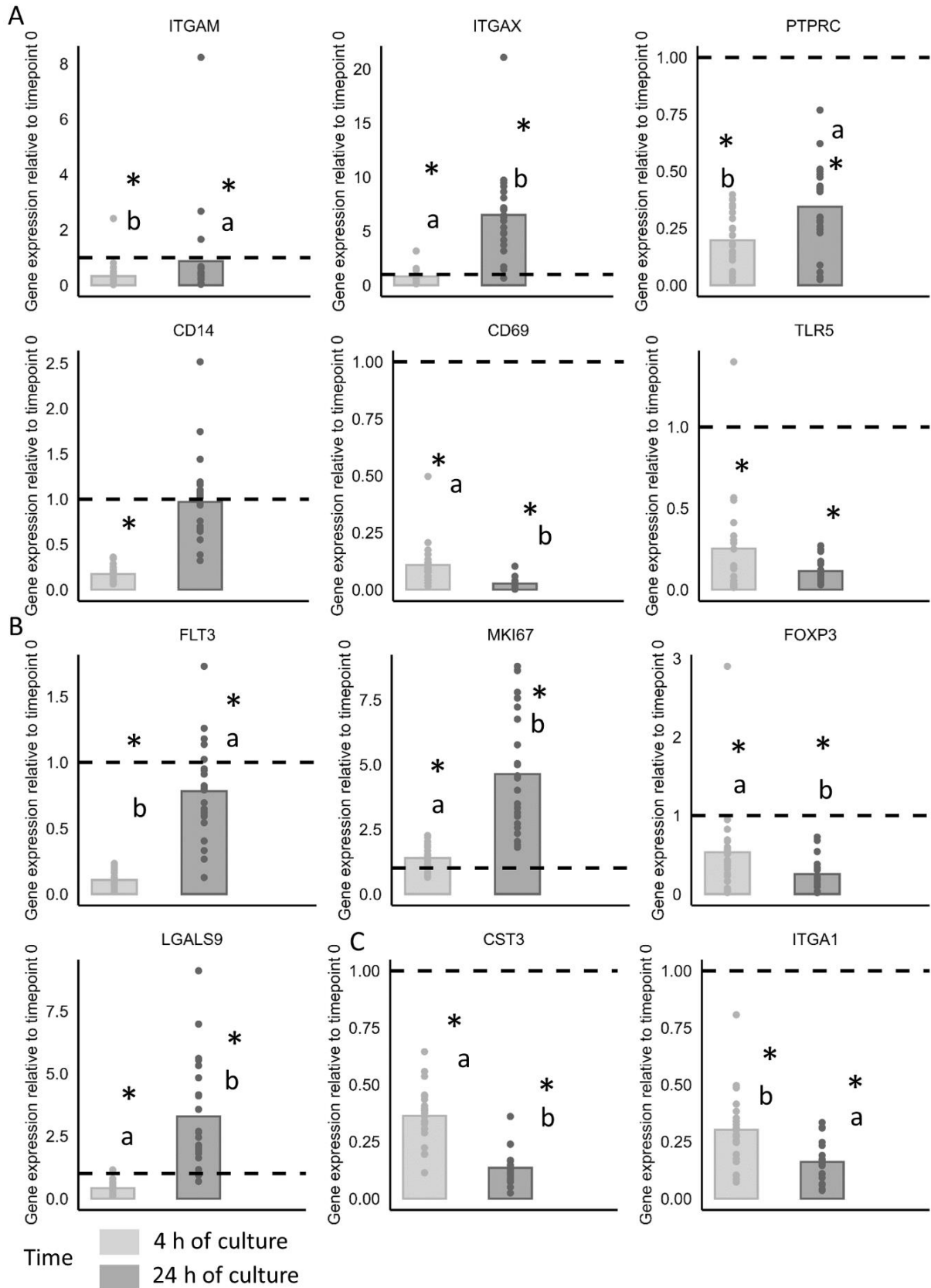


Figure 6: Relative expression of genes coding for (A) immune cell markers and receptors, (B) cell regulation and differentiation and (C) others immune pattern in rabbit cecal LPMCs in culture for 4 and 24 h (n = 24 rabbits). Gene expression data are normalized to timepoint 0 (baseline) without log transformation. Mean values with a different superscript differ ( $p < 0.05$ ), \* significantly different from timepoint 0 ( $p < 0.05$ ).

These results indicate that while the LPMCs survive and some even proliferate *in vitro*, their immune phenotype evolve in culture condition. This must be taken into account during analyses and highlights the importance of stimulation to preserve certain phenotypes.

## Evaluation of the stimulation methods

### *Dose dependent effects of the stimulants*

The effect of stimulants on the viability and proliferation of the LPMCs in culture was assessed after 24 h of culture with different doses of the stimulants (experiment 1). PMA-ionomycin stimulation had no effect on the viability of cells (Figure 7A). It must be noted that interindividual variability was important in this experiment, with one rabbit having a great increase in cell number after 24 h of culture. Treatment with LPS decreased the number of cells, regardless of the concentration of LPS, compared to the control group after 24 h of culture ( $p$ -value < 0.05) (Figure 7B). For further experiments we then selected the lowest test dose for each stimulant, namely 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of PMA and 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of LPS.

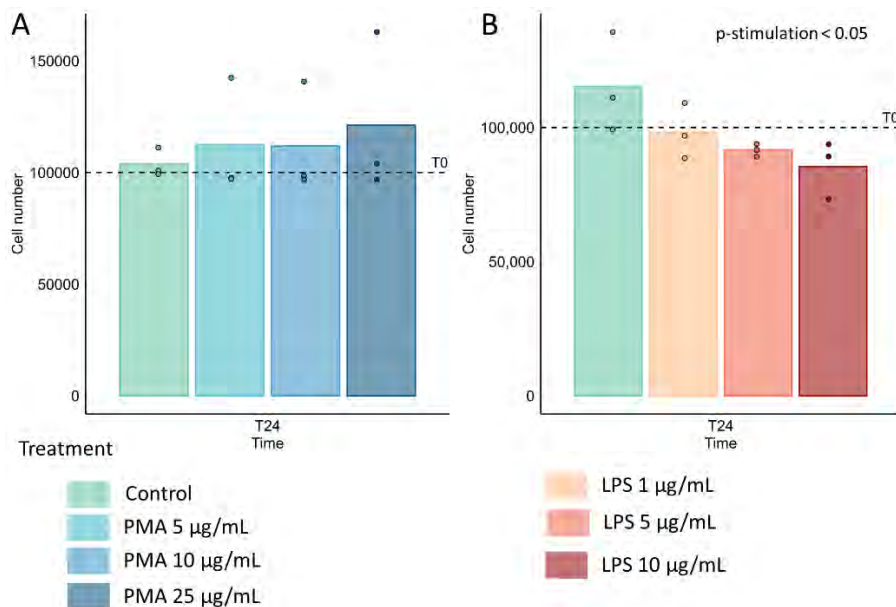


Figure 7: Cell viability of LPMCs at 24 h left unstimulated (Control) or treated with (A) three doses of PMA and 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of ionomycin or (B) three doses of LPS ( $n = 3$  rabbits). LPS: Lipopolysaccharides; PMA: Phorbol-12-myristate-13-acetate.

### *Modulation of the immune-related genes*

Our objective was to evaluate the efficiency of the stimulants used on our LPMCs to modulate immune-gene expression. LPMCs were either in basal conditions or exposed to 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of PMA with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of ionomycin (experiment 2) or 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS (experiment 3) for 4 or 24 h. Viability and proliferation of the LPMCs stimulated was assessed after 4 and 24 h of culture. In experiment 2, the number of viable cells decreased with PMA-ionomycin treatment after 4 h of culture ( $p$ -value < 0.05) (Figure 8A) compared to untreated cells, while treatment had no effect after 24 h of culture (Figure 8B).

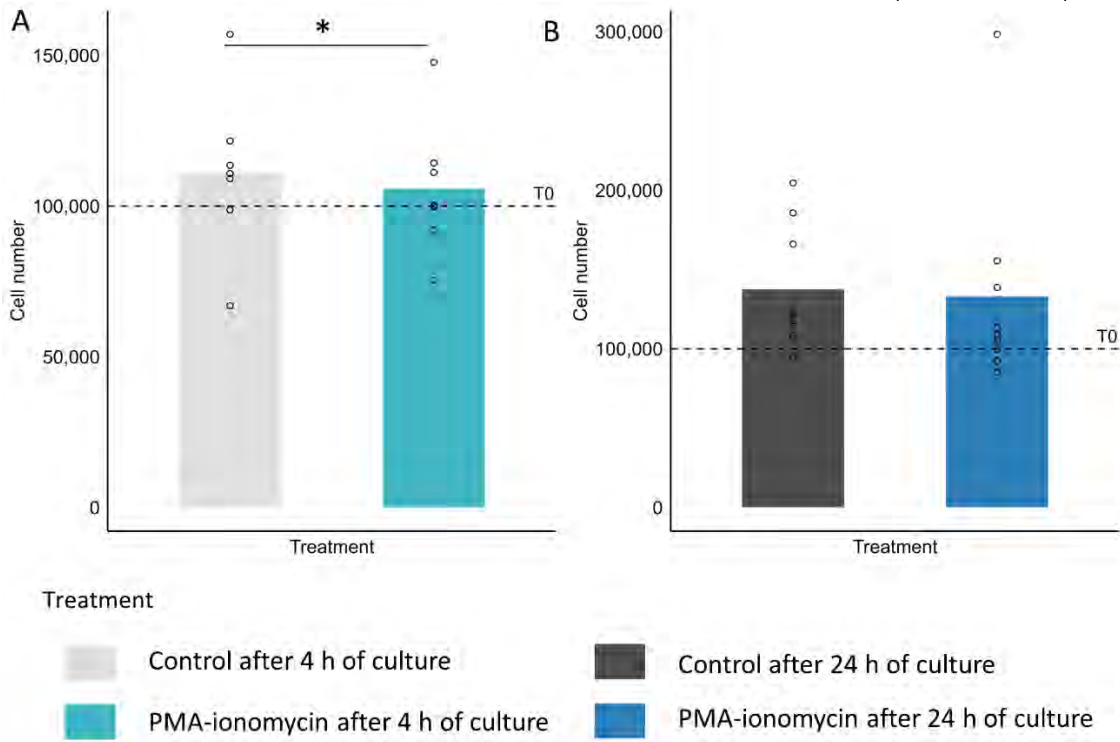


Figure 8: Cell viability assay of rabbit cecal LPMCs left unstimulated (Control) or treated with PMA-ionomycin after (A) 4 or (B) 24 h of culture ( $n = 7$  or  $9$  rabbits). \* significantly different mean values between treatment ( $p < 0.05$ ), PMA: Phorbol-12-myristate-13-acetate.

In experiment 3, the number of viable cells was not affected by LPS treatment after 4 h of culture (Figure 9A), while it significantly decreased after 24 h of culture ( $p$ -value  $< 0.001$ ) compared to untreated cells (Figure 9B).

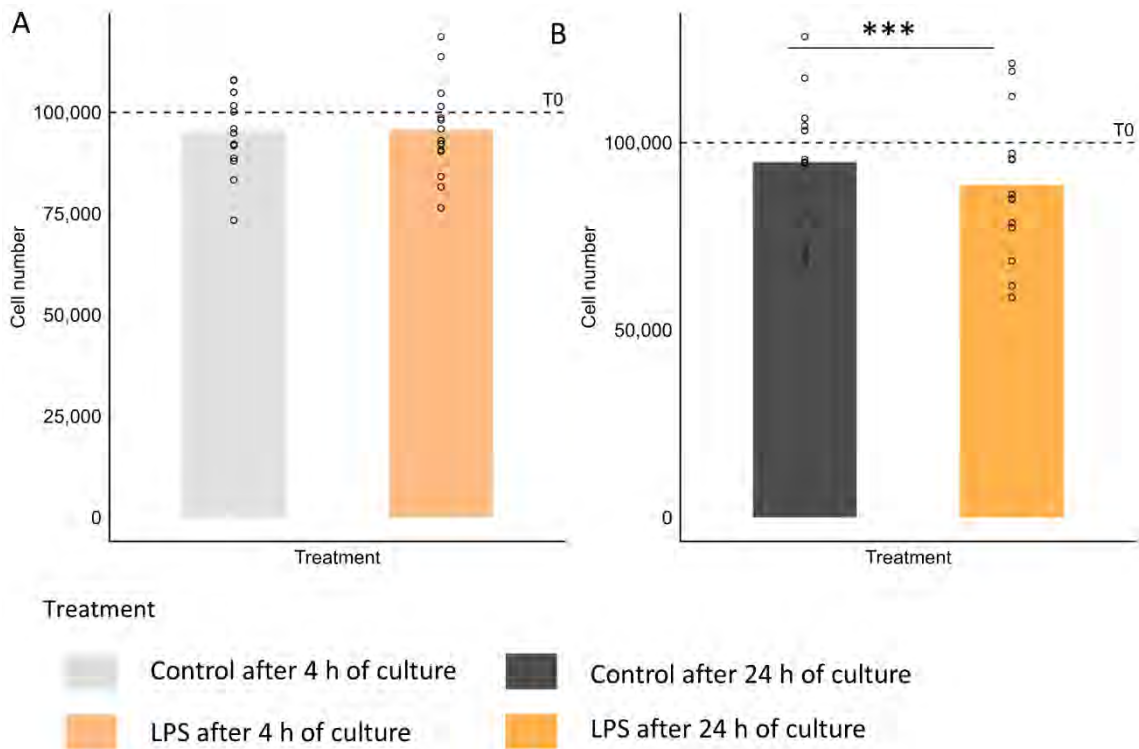


Figure 9: Cell viability assay of rabbit cecal LPMCs left unstimulated (Control) or treated with LPS after (A) 4 or (B) 24 h of culture ( $n = 7$  or  $9$  rabbits). \*\*\* significantly different mean values between treatment ( $p < 0.001$ ), LPS: Lipopolysaccharides.

## Stimulation with PMA-ionomycin

In experiment 2, the stimulation of LPMCs with PMA-ionomycin was used to broadly stimulate lymphocytes. The expression of 33 % and 50 % of the genes were significantly upregulated while 33 % and 17 % were downregulated by PMA-ionomycin stimulation after 4 and 24 h of culture, respectively (Table S4 and Table S5). Unsurprisingly stimulation with PMA-ionomycin induced an early upregulation of the expression of Th2 and Treg associated cytokines, such as IL4 (64 higher after 4 h of culture), IL13 (190-fold higher after 4 h of culture) and FOXP3 (6 to 19-fold higher after 4 and 24 h of culture, respectively) (Figure 10A and B and 11A and B). PMA-Ionomycin also upregulated the expression of pro-inflammatory cytokines after both timepoints, IL6 (2 to 4-fold higher after 4 and 24 h of culture, respectively), CXCL8, also known as IL8 (2 to 3-fold higher after 24 and 4 h of culture, respectively), IL17A (3 to 4-fold higher) and TNF (6 to 11-fold higher), while IL15 was solely upregulated after 24 h (5-fold higher) (Figure 10A and 11A). On the contrary, expressions of IL18 after 4 h of culture and IL1B after 24 h were slightly downregulated (1.5-fold lower for both). Similarly, while the expression of the tolerance receptor IL2RA increased after 4 and 24 h (2 and 5-fold higher, respectively), the expression of the anti-inflammatory cytokine TGF $\beta$ 1 decreased after 24 h (1.5-fold lower) (Figure 10A and 11A). It also upregulated the expression of T lymphocyte positive co-stimulation molecules CD80 (2 to 3-fold higher after 4 and 24 h of culture, respectively) and CD86 (2 to 4-fold higher after 4 and 24 h of culture, respectively) expressed on antigen-presenting cells, indicating an activation of these cells, which further promotes T lymphocyte stimulation. This T cell activation cascade was confirmed by the upregulation of the expression of CD69 (7 to 103-fold higher after 4 and 24 h of culture, respectively), an early T cell activation marker, while expression of CD14 was downregulated at both timepoints (2.2 and 3-fold lower after 4 and 24 h, respectively) (Figure 10B and 11B). Genes related to integrins and cell adhesion were also modulated during culture with PMA-ionomycin. Interestingly, expression of ITGAM was slightly decreased after 4 h (1.9-fold lower) and increased after 24 h along with ITGAX (2.6 and 2-fold higher, respectively). PTPRC expression, was upregulated after 24 h (2.6-fold higher) (Figure 10B and 11B). Expression of genes involved in chemotaxis was also upregulated. CCL20 was strongly upregulated after 4 and 24 h (62 and 358-fold higher), as well as CXCL10 but only after 24 h of culture (29-fold higher) while the expression of the chemokine receptor CCR5 was mildly upregulated early in culture (2-fold higher) prior to a slight downregulation later in culture (1.3-fold lower) (Figure 10C and D and Figure 11C and D). S100A8 and S100A9 expressions, were greatly decreased at both timepoints, particularly after 24 h of culture (2.8 and 4-fold lower, respectively at 4 h and 15 and 5-fold lower, respectively at 24 h) (Figure 10E and 11E). Similarly, CST3 expression, was weakly reduced after 4 h of culture (1.3-fold lower), however after 24 h the expression increased (2.8-fold higher). JCHAIN expression was increased, particularly after 24 h (1.6 and 8.8-fold higher after 4 and 24 h, respectively) demonstrating a potential stimulation of B cells (Figure 10E and 11E). Expressions of innate immune receptors, TLR2, TLR3 and TLR4 were downregulated early in culture (1.3 to 3.5-fold lower) and returned to control levels after 24 h (Figure 10F and 11F). Regarding dendritic cell markers, FLT3 expression was significantly downregulated after 4 hours (1.4-fold lower) which persisted at timepoint 24 h (4.5-fold lower) (Figure 10G and 11G).

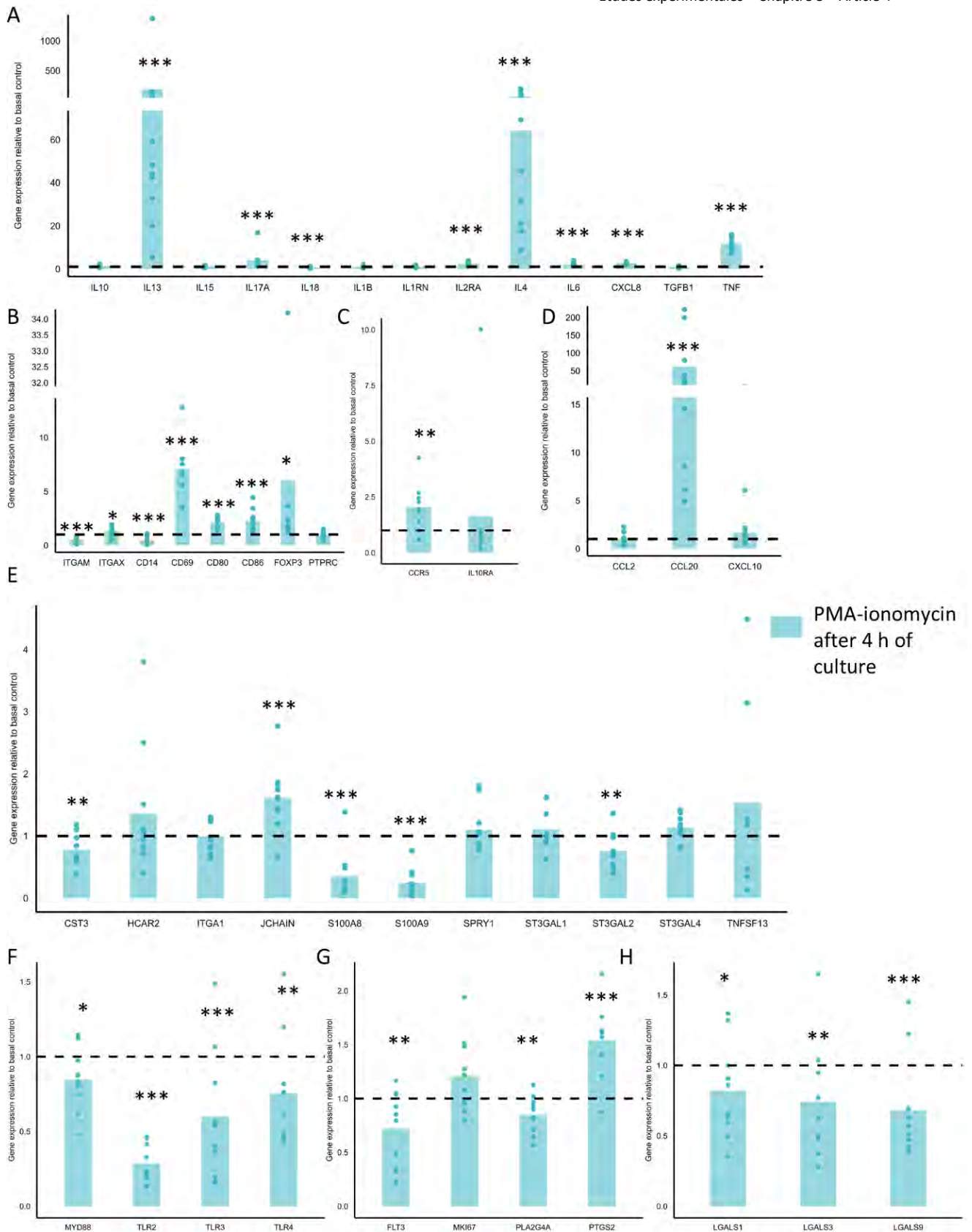


Figure 10: Relative expression of genes coding for (A) cytokines, (B) co-stimulation, (C) cytokine and chemokine receptors, (D) chemokines, (E) others immune genes, (F) pattern recognition receptors, (G) activation and proliferation and (H) galectins in rabbit cecal LPMCs stimulated with PMA-ionomycin for 4 h (n = 10 rabbits). Gene expression data are normalized to controls without log transformation. PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate \* significantly different from control (0.01 < p < 0.05), \*\* significantly different from control (0.001 < p < 0.01), \*\*\* significantly different from control (p < 0.001).

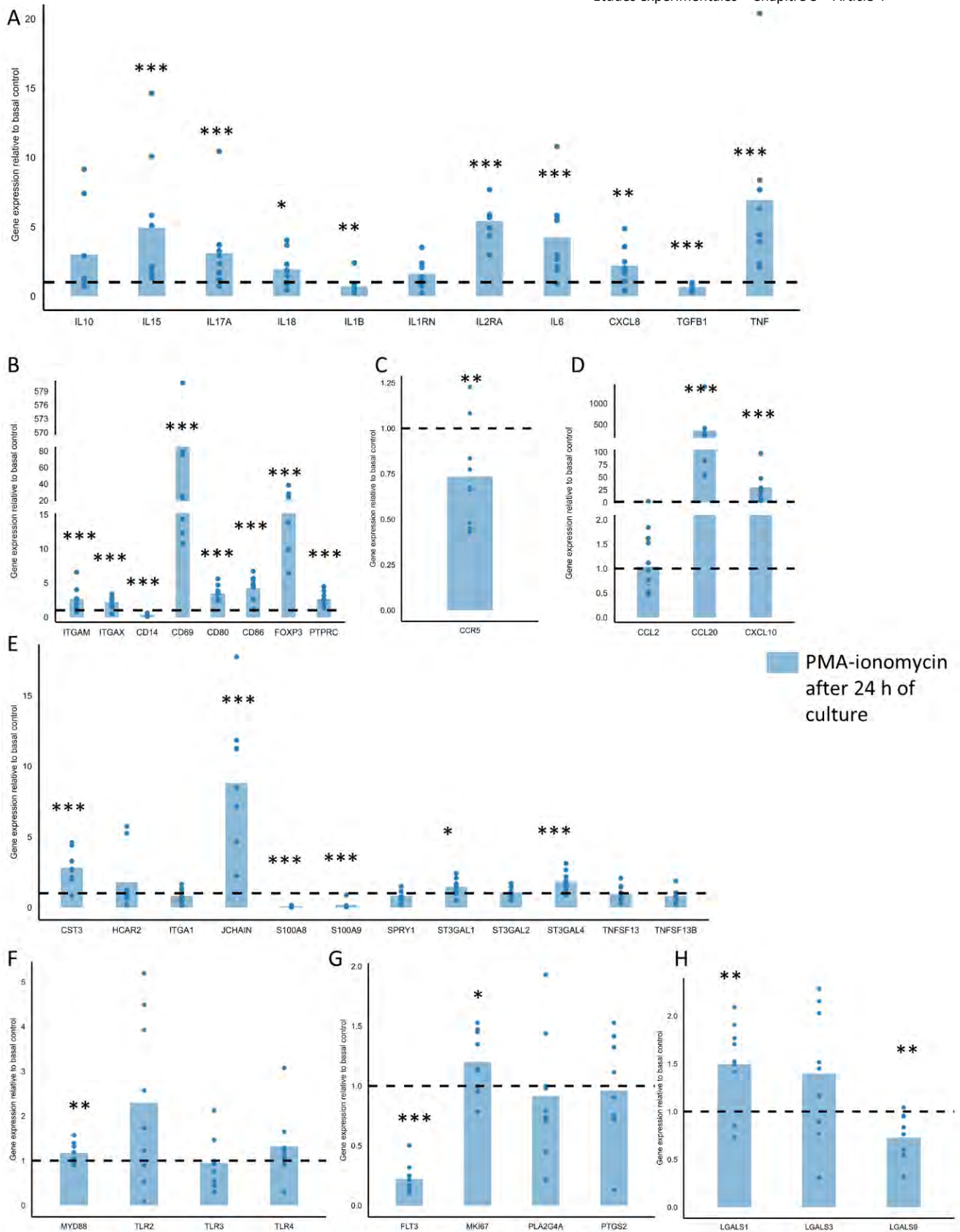


Figure 11: Relative expression of genes coding for (A) cytokines, (B) co-stimulation, (C) cytokine and chemokine receptors, (D) chemokines, (E) others immune genes, (F) pattern recognition receptors, (G) activation and proliferation and (H) galectins in rabbit cecal LPMCs stimulated with PMA-ionomycin for 24 h (n = 10 rabbits). Gene expression data are normalized to controls without log transformation. PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate \* significantly different from control (0.01 < p < 0.05), \*\* significantly different from control (0.001 < p < 0.01), \*\*\* significantly different from control (p < 0.001).

## Stimulation with LPS

In experiment 3, stimulation with LPS was used to primarily activate innate immune pathways. LPS upregulated the expression of 40 % and 28 % of the genes and downregulated the expression of 10 % and 39 % of the genes after 4 and 24 h of culture respectively (Table S6 and Table S7). As expected, LPS induced a typical pro-inflammatory response, increasing the expression of pro-inflammatory cytokines IL1B (1.5 to 2-fold higher after 4 and 24 h of culture, respectively), TNF, also known as TNF $\alpha$  (2 to 3.5-fold higher after 4 and 24 h of culture, respectively), IL6 (2.5 to 11-fold higher after 4 and 24 h of culture, respectively), IL27 (4-fold higher after 4 h of culture), IL4 (3-fold higher after 4 h of culture), IL13 (2.3-fold higher after 4 h of culture) and CXCL8, also known as IL8 (1.6 to 2.3 after 4 and 24 h of culture, respectively) (Figure 12A and 13A). However, the expression of the anti-inflammatory cytokine IL10 and the receptor involved in tolerance, IL2RA were slightly upregulated after 4 h (3 and 1.3-fold higher, respectively) and 24h, particularly for IL10 (11-fold higher). The expression of the IL1 receptor antagonist IL1RN was downregulated after 4 and 24 h of culture (1.2 and 2.6-fold lower, respectively). Similarly, after 24 h, the expression of the pro-inflammatory cytokine IL18 decreased (2-fold lower) (Figure 12A and 13A). Interestingly, a downregulation of innate immune receptors, TLR4 (1.3 to 1.7 lower after 4 and 24 h of culture, respectively), CD14 (1.5 lower after 4 and 24 h of culture) (Figure 12B and C and Figure 13B and C) and antigen-presenting cell markers, ITGAM, also known as CD11b (2.61 lower after 24 h of culture), ITGAX, also known as CD11c (1.7 lower after 4 and 24 h of culture) and CD86 (1.2 lower after 24 h of culture) (Figure 12B and Figure 13B) was observed, suggesting a regulatory feedback mechanism. Expression of the chemokine CXCL10 was upregulated, especially after 24 h (4-fold higher) while chemokines CCL2, CCL20 and the chemokine receptor CCR5 decreased after 24 h of culture (1.3 to 3-fold lower) (Figure 12D and E and 13D and E). S100A8 and S100A9 expressions, were increased at both timepoints, particularly at 24 h of culture (1.5 to 4.7-fold higher) (Figure 12F and 13F). Finally, LPS downregulated the expression of the galectins LGALS3 and LGSL9 after 24 h (1.2 and 1.8-fold lower, respectively) (Figure 12G and 13G).

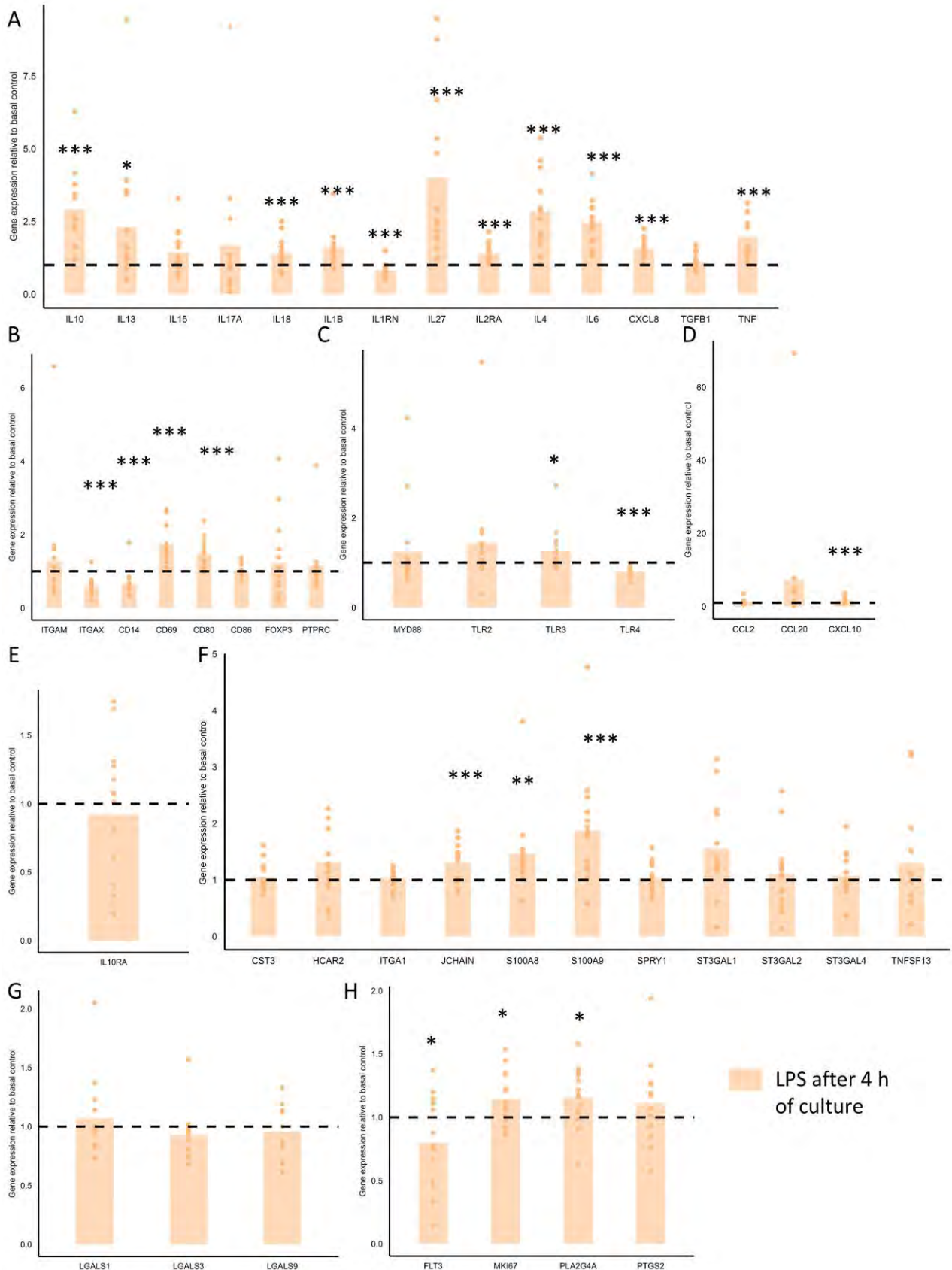


Figure 12: Relative expression of genes coding for (A) cytokines, (B) co-stimulation, (C) pattern recognition receptors (D) chemokines, (E) cytokine and chemokine receptors, (F) others immune genes, (G) galectins and (H) activation and proliferation in rabbit cecal LPMCs stimulated with LPS for 4 h (n = 8 rabbits). Gene expression data are normalized to controls without log transformation. LPS: lipopolysaccharide, \* significantly different from control (0.01 < p < 0.05), \*\* significantly different from control (0.001 < p < 0.01), \*\*\* significantly different from control (p < 0.001).

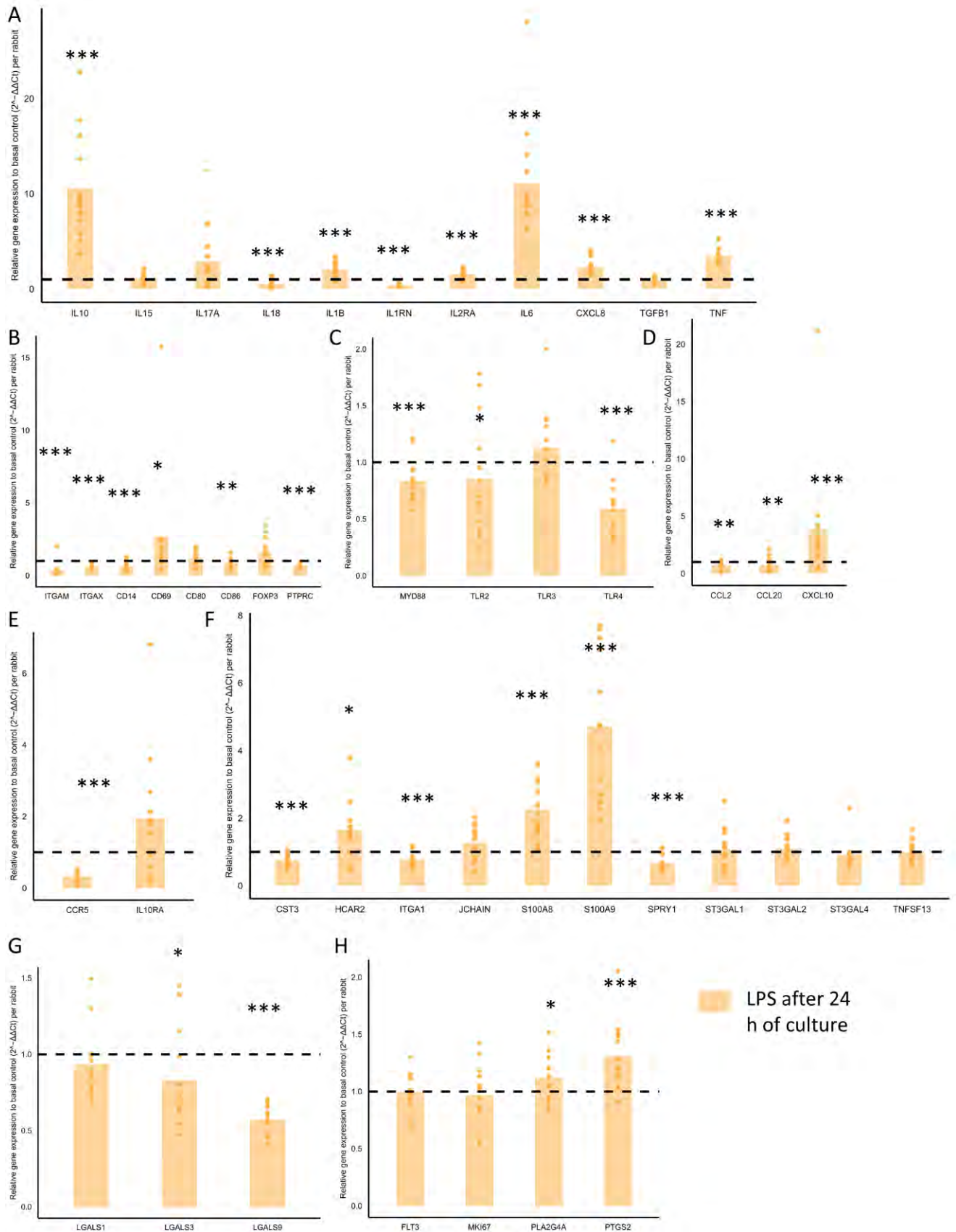


Figure 13: Relative expression of genes coding for (A) cytokines, (B) co-stimulation, (C) pattern recognition receptors (D) chemokines, (E) cytokine and chemokine receptors, (F) others immune genes, (G) galectins and (H) activation and proliferation in rabbit cecal LPMCs stimulated with LPS for 24 h ( $n = 8$  rabbits). Gene expression data are normalized to controls without log transformation. LPS: lipopolysaccharide, \* significantly different from control ( $0.01 < p < 0.05$ ), \*\* significantly different from control ( $0.001 < p < 0.01$ ), \*\*\* significantly different from control ( $p < 0.001$ ).

## Discussion

The objective of this study was to design a protocol for the isolation and culture of LPMCs in rabbits, allowing for downstream functional analyses. Our protocol enables the successful recovery and culture of a high yield of viable LPMCs covering the cellular diversity of the gut immune cells from the rabbit cecum. Our study also enabled us to validate two efficient *in vitro* immune stimulation methods of the rabbit cecal LPMCs.

In rabbits, the cecum is a large organ, accounting for approximately 9 % of the total intestinal length, and harbors a highly complex and abundant microbiota (Combes et al., 2011). This makes the rabbit particularly well suited for investigating microbiota-immunity system interactions. Furthermore, rabbits possess two distinctive structures rich in lymphoid follicles: the *sacculus rotundus*, located at the ileocecal junction, and a particularly well developed vermiform appendix (Merchant et al., 2011; Haines et al., 2016). Considering the relevance of the rabbit as an experimental model, we developed a protocol to isolate *lamina propria* mononuclear cells from the rabbit cecum. Although the number of isolated cells was highly variable between experiments, as previously described in other cell isolation models (Barnett et al., 2005; Kin et al., 2007; Trapecar et al., 2017; Benmeziane et al., 2022), we obtained highly satisfactory levels of viable cells (> 90 %). Moreover, the identification of cell phenotypes revealed that, in our study, 16 % of the cells isolated were CD45<sup>+</sup>, among which the main identified immune cell populations were macrophages, dendritic cells, B and T lymphocytes, as expected in the *lamina propria* (Wittig and Zeitz, 2003). The high cell yields along with the cell type representativity indicate the efficiency of our rabbit cecal LPMCs isolation model.

Our second objective was to maintain viable LPMCs in culture. For culturing the cells, we used IMDM medium, since it has been demonstrated as suitable for T cells derived from human LPMCs (Schreurs et al., 2021). The concentration of Ca<sup>2+</sup>, higher than in other frequently used media, favor cytokines expression which is required for analyses of immune responses (Zimmermann et al., 2015). Cells were able to proliferate *in vitro* as demonstrated by an increase in the number of viable cells with incubation time. However, cells did not retain their *in vivo* phenotype, as gene expression was strongly altered *in vitro*. Early (4 h) and later (24 h) culture times induced major changes in inflammation, chemotaxis, cell adhesion, co-stimulation and innate sensing pathways. Between 4 and 24 h of culture, several gene expressions were significantly different, indicating a time-dependent modulation. Notably, the expression of 39 % of the genes that were downregulated after 4 h of culture showed increased expression at 24 h, with some even returning to baseline expressions (timepoint 0) or exceeding them, such as IL15, CD14, ITGAX and S100A8. In contrast, 22 % of the genes exhibited a further decrease in expression at 24 h, suggesting an accentuation of the downregulation over time. Overall, the *in vitro* culture led to a marked shift in immune phenotype, including a reduced activation and signaling. Several studies have already highlighted the discordance between gene expression in culture to that *in vivo*, in PBMCs, synovial fibroblasts and adipose stem cells (Lindsey et al., 2007; Neumann et al., 2010; Januszyk et al., 2015). Especially in immune cells, RNA-seq analyses revealed that *in vitro* expansion of T cells induces DNA hypermethylation, resulting in transcriptional downregulation of genes involved in signaling and cell adhesion, increasing with culture time

(Salz et al., 2023). All these studies concluded that this phenotype change is already induced at the beginning of the culture, and become even more pronounced with time, which was the case for 22 % of the genes in this study, particularly TLR5, JCHAIN and CD69. Such differences highlight the importance of considering *in vivo/in vitro* discrepancies when drawing conclusions from cell culture data.

Finally, we aimed to validate efficient stimulation methods. In a mixture of cells, antibody stimulation is not suitable since it targets specific immune cells (Lawlor et al., 2021). Thus, we decided to test nonspecific stimulants, the inflammatory bacterial component LPS and the mitogen PMA-ionomycin. Prior to assessing the immunomodulation of LPMCs by stimulants, we tested multiple doses to ensure the absence of cytotoxic effects. Stimulation with PMA-ionomycin had no effect on the number of viable cells after 24 h of culture, while LPS induced a slight decrease (around 2 % with the lowest dose and 15 % with the highest) in the number of cells after 24 h of culture. This weak cell proliferation has already been described in human PBMCs stimulated with LPS (Molae et al., 2017). Consequently, we used the lowest doses, 5 µg/mL of PMA and 1 µg/mL of LPS.

The association of PMA and ionomycin is known to activate immune cells, especially T cells, *in vitro*. PMA activates Protein Kinase C, enzymes involved in signal transduction which leads to the activation of transcription factor such as NF-κB. Ionomycin is a calcium ionophore, increasing intracellular calcium concentration which is normally associated to stimulation of T cells receptors. They synergistically activate major transcription factor for strong polyclonal activation of T cells and other immune cells (Truneh et al., 1985). In our study, PMA-ionomycin broadly activated lymphocytes, strongly upregulating Th2 and Treg cytokines, T cell activation markers, and pro-inflammatory cytokines, consistent with a potent immune stimulation. Chemokines involved in cell recruitment were also markedly increased. Consistent with our results, the stimulation of rabbit LPMCs with PMA-ionomycin has already shown an activation of T lymphocytes, with the increase of the expression of T lymphocyte-related genes such as CD69, IL4, IL13 (Jacquier et al., 2015).

LPS signals through TLR4, predominantly expressed on myeloid cells such as macrophages and dendritic cells, and is known to activate a wide variety of cell types and be responsible for an inflammatory response even at weak doses (Ciesielska et al., 2021). In our study, LPS stimulation induced a robust pro-inflammatory response characterized by an upregulation of multiple cytokines and chemokines typical of innate immune activation. This pro-inflammatory effect has already been demonstrated in rabbit and rat PBMCs (Ai et al., 2013; Jacquier et al., 2015). Ai et al. (2013) showed a significant upregulation of TNF-α and IL4 on rat PBMCs after 2 and 6 h of stimulation with LPS. Simultaneously, in our study there is evidence of regulatory feedback through downregulation of innate immune receptors and antigen-presenting cell markers, and upregulation of anti-inflammatory mediators such as IL10 and IL2RA, which was also the case in the study of Ai et al. (2013) where IL10 increased after 4 h of LPS-stimulation. Surprisingly, TLR4 and CD14 expression were downregulated upon LPS stimulation, although they are key components of the innate immune system recognition and signaling pathways for LPS stimulation (Björkbacka et al., 2004). This downregulation has already been noticed *in vivo* in humans (Hojman et al., 1997), which could be due to an

immunosuppressive effect of LPS (Byrne and Reen, 2002). Moreover, in a study of human jejunum *lamina propria* macrophages exposed to LPS, CD14 has been shown to be downregulated (Smythies et al., 2005). Similarly, the surface expression of CD14, CD11b and CD11c were shown to be low in macrophages from human colonic *lamina propria* (Rogler et al., 1998). Finally, our results are also consistent with those of Jacquier et al. (2015), who investigated the impact of LPS on rabbit PBMCs. They reported a downregulation of CD14 expression and an upregulation of the expression of proinflammatory genes such as IL6, TNF and IL1B, particularly after 24 h of culture, which aligns with our findings.

Overall, stimulation appeared to mitigate the culture-associated decrease in the expression of specific genes. This compensatory effect was observed with both types of stimulation and concerned genes involved in various immune functions. For instance, stimulation re-induced the expression of the chemokine CCL20, the lymphocyte activation marker CD69, the costimulatory molecule CD80, the regulatory T cell transcription factor FOXP3 as well as cytokines such as IL13 and IL10. These genes exhibited a marked decrease in expression during culture, highlighting the capacity of stimulation to restore their expression. These results confirm the validity of our model of culture and stimulation.

### Conclusion

This study proposes a protocol for isolation, culture and stimulation of rabbit cecal LPMCs. LPMCs remained viable in culture but their phenotype was greatly affected. Given the results of two stimulation assays and the heterogeneity of the LPMC population, which includes both innate and adaptive immune cells, we validated two distinct stimulation methods. LPS, to primarily activate innate immune pathways, and PMA-ionomycin to broadly stimulate lymphocytes.

### References

- Ai, W., Li, H., Song, N., Li, L., and Chen, H. (2013). Optimal Method to Stimulate Cytokine Production and Its Use in Immunotoxicity Assessment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10, 3834–3842. doi: 10.3390/ijerph10093834
- Arrazuria, R., Pérez, V., Molina, E., Juste, R. A., Khafipour, E., and Elguezabal, N. (2018). Diet induced changes in the microbiota and cell composition of rabbit gut associated lymphoid tissue (GALT). *Scientific Reports* 8, 14103. doi: 10.1038/s41598-018-32484-1
- Barnett, M. J., Zhai, X. (Wendy), LeGatt, D. F., Cheng, S. B., Shapiro, A. M. J., and Lakey, J. R. T. (2005). Quantitative Assessment of Collagenase Blends for Human Islet Isolation. *Transplantation* 80, 723. doi: 10.1097/01.TP.0000174133.96802.DE
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., and Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software* 67, 1–48. doi: 10.18637/jss.v067.i01
- Benmeziane, K., Delache, B., Langlois, S., Scarlatti, G., Le Grand, R., and Cavarelli, M. (2022). Isolation and phenotypic characterization of human and nonhuman primate intestinal lamina propria mononuclear cells. *STAR Protocols* 3, 101815. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101815

Björkbacka, H., Fitzgerald, K. A., Huet, F., Li, X., Gregory, J. A., Lee, M. A., et al. (2004). The induction of macrophage gene expression by LPS predominantly utilizes Myd88-independent signaling cascades. *Physiological Genomics* 19, 319–330. doi: 10.1152/physiolgenomics.00128.2004

Burke Schinkel, S. C., Barros, P. O., Berthoud, T., Byrareddy, S. N., McGuinty, M., Cameron, D. W., et al. (2024). Comparative analysis of human gut- and blood-derived mononuclear cells: contrasts in function and phenotype. *Frontiers in Immunology* 15, 1336480. doi: 10.3389/fimmu.2024.1336480

Byrne, A., and Reen, D. J. (2002). Lipopolysaccharide Induces Rapid Production of IL-10 by Monocytes in the Presence of Apoptotic Neutrophils<sup>1</sup>. *The Journal of Immunology* 168, 1968–1977. doi: 10.4049/jimmunol.168.4.1968

Ciesielska, A., Matyjek, M., and Kwiatkowska, K. (2021). TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* 78, 1233–1261. doi: 10.1007/s00018-020-03656-y

Combes, S., Michelland, R. J., Monteils, V., Cauquil, L., Soulié, V., Tran, N. U., et al. (2011). Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity: Postnatal development of rabbit caecal microbiota. *FEMS Microbiology Ecology* 77, 680–689. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01148.x

Fox, J., Weisberg, S., Price, B., Adler, D., Bates, D., Baud-Bovy, G., et al. (2024). car: Companion to Applied Regression. Available at: <https://cran.r-project.org/web/packages/car/index.html>

Haines, R. A., Urbiztondo, R. A., Haynes, R. A. H., II, Simpson, E., Niewiesk, S., and Lairmore, M. D. (2016). Characterization of New Zealand White Rabbit Gut-Associated Lymphoid Tissues and Use as Viral Oncology Animal Model. *ILAR Journal* 57, 34–43. doi: 10.1093/ilar/ilw004

Hojman, H., Lounsbury, D., Harris, H., and Horn, J. K. (1997). Immunodepressive effects of LPS on monocyte CD14 in vivo. *The Journal of Surgical Research* 69, 7–10. doi: 10.1006/jsre.1997.5010

Jacquier, V., Estellé, J., Schmaltz-Panneau, B., Lecardonnel, J., Moroldo, M., Lemonnier, G., et al. (2015). Genome-wide immunity studies in the rabbit: transcriptome variations in peripheral blood mononuclear cells after in vitro stimulation by LPS or PMA-Ionomycin. *BMC Genomics* 16, 26. doi: 10.1186/s12864-015-1218-9

Januszyk, M., Rennert, R. C., Sorkin, M., Maan, Z. N., Wong, L. K., Whittam, A. J., et al. (2015). Evaluating the Effect of Cell Culture on Gene Expression in Primary Tissue Samples Using Microfluidic-Based Single Cell Transcriptional Analysis. *Microarrays (Basel)* 4, 540–550. doi: 10.3390/microarrays4040540

Kim, E., Tran, M., Sun, Y., and Huh, J. R. (2022). Isolation and analyses of lamina propria lymphocytes from mouse intestines. *STAR Protocols* 3, 101366. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101366

Kin, T., Johnson, P. R. V., Shapiro, A. M. J., and Lakey, J. R. T. (2007). Factors Influencing the Collagenase Digestion Phase of Human Islet Isolation. *Transplantation* 83, 7. doi: 10.1097/01.tp.0000243169.09644.e6

- Lawlor, N., Nehar-Belaid, D., Grassmann, J. D. S., Stoeckius, M., Smibert, P., Stitzel, M. L., et al. (2021). Single Cell Analysis of Blood Mononuclear Cells Stimulated Through Either LPS or Anti-CD3 and Anti-CD28. *Frontiers in Immunology* 12, 636720. doi: 10.3389/fimmu.2021.636720
- Laybourn, K. A., Hiserodt, J. C., Hunt, J. M., Sell, S., and Strayer, D. S. (1990). Natural cell-mediated immunity in the rabbit. *Cellular Immunology* 129, 519–527. doi: 10.1016/0008-8749(90)90226-h
- Lenth, R. V., Banfai, B., Bolker, B., Buerkner, P., Giné-Vázquez, I., Herve, M., et al. (2025). emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. Available at: <https://cran.r-project.org/web/packages/emmeans/index.html>
- Lindsey, W. B., Lowdell, M. W., Marti, G. E., Abbasi, F., Zenger, V., King, K. M., et al. (2007). CD69 expression as an index of T-cell function: assay standardization, validation and use in monitoring immune recovery. *Cytotherapy* 9, 123–132. doi: 10.1080/14653240601182838
- MacDonald, T. (2008). News & Highlights. *Mucosal Immunology* 1, 246–247. doi: 10.1038/mi.2008.17
- Merchant, H. A., McConnell, E. L., Liu, F., Ramaswamy, C., Kulkarni, R. P., Basit, A. W., et al. (2011). Assessment of gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue in the guinea pig, rabbit and pig, and implications for their use in drug development. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 42, 3–10. doi: 10.1016/j.ejps.2010.09.019
- Molaae, N., Mosayebi, G., Pishdadian, A., Ejtehadifar, M., and Ganji, A. (2017). Evaluating the Proliferation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Using MTT Assay. *International Journal of Basic Science in Medicine* 2, 25–28. doi: 10.15171/ijbsm.2017.06
- Neumann, E., Riepl, B., Knedla, A., Lefèvre, S., Tarner, I. H., Grifka, J., et al. (2010). Cell culture and passaging alters gene expression pattern and proliferation rate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Research & Therapy* 12, R83. doi: 10.1186/ar3010
- Powell, D. W., Pinchuk, I. V., Saada, J. I., Chen, X., and Mifflin, R. C. (2011). Mesenchymal Cells of the Intestinal Lamina Propria. *Annual Review of Physiology* 73, 213–237. doi: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100646
- Rogler, Hausmann, Vogl, Aschenbrenner, Andus, Falk, et al. (1998). Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. *Clinical & Experimental Immunology* 112, 205–215. doi: 10.1046/j.1365-2249.1998.00557.x
- Salz, L., Seitz, A., Schäfer, D., Franzen, J., Holzer, T., Garcia-Prieto, C. A., et al. (2023). Culture expansion of CAR T cells results in aberrant DNA methylation that is associated with adverse clinical outcome. *Leukemia* 37, 1868–1878. doi: 10.1038/s41375-023-01966-1
- Schreurs, R. R. C. E., Baumdick, M. E., Drewniak, A., and Bunders, M. J. (2021). In vitro co-culture of human intestinal organoids and lamina propria-derived CD4+ T cells. *STAR Protocols* 2, 100519. doi: 10.1016/j.xpro.2021.100519
- Sheppard, H. W., Redelman, D., and Sell, S. (1976). In vitro studies of the rabbit immune system. *Cellular Immunology* 24, 34–44. doi: 10.1016/0008-8749(76)90129-5

Smythies, L. E., Sellers, M., Clements, R. H., Mosteller-Barnum, M., Meng, G., Benjamin, W. H., et al. (2005). Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *Journal of Clinical Investigation* 115, 66–75. doi: 10.1172/JCI200519229

Trapezar, M., Khan, S., Roan, N. R., Chen, T.-H., Telwatte, S., Deswal, M., et al. (2017). An Optimized and Validated Method for Isolation and Characterization of Lymphocytes from HIV+ Human Gut Biopsies. *AIDS research and human retroviruses* 33, S31–S39. doi: 10.1089/AID.2017.0208

Truneh, A., Albert, F., Golstein, P., and Schmitt-Verhulst, A.-M. (1985). Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester. *Nature* 313, 318–320. doi: 10.1038/313318a0

Weigmann, B., Tubbe, I., Seidel, D., Nicolaev, A., Becker, C., and Neurath, M. F. (2007). Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. *Nature Protocols* 2, 2307–2311. doi: 10.1038/nprot.2007.315

Wittig, B., and Zeitz, M. (2003). The gut as an organ of immunology. *International Journal of Colorectal Disease* 18, 181–187. doi: 10.1007/s00384-002-0444-1

Zimmermann, J., Radbruch, A., and Chang, H.-D. (2015). A Ca<sup>2+</sup> concentration of 1.5 mM, as present in IMDM but not in RPMI, is critical for maximal response of Th cells to PMA/ionomycin. *European Journal of Immunology* 45, 1270–1273. doi: 10.1002/eji.201445247

## Supplementary data

Table S1: Characteristics of the individuals sampled for the experiments

Rabbit	Rabbit age (days)	Experiment	Number of cells isolated	Cecum sample weight (g)	Cells per g of tissue
1	23	1	14 700 000	2.5	6 000 000
2	23	1	6 410 000	2.2	2 874 439
3	23	1	4 470 000	2.3	1 910 256
4	23	1	8 140 000	2.8	2 886 525
5	21	2	5360000	3.0	1 786 667
6	21	2	9130000	3.3	2 783 537
7	21	2	2275000	3.1	726 837
8	21	2	18150000	5.2	3 490 385
9	22	2	2090000	4.1	509 756
10	22	2	8 790 000	3.1	2 835 484
11	24	2	11 200 000	3.8	2 931 937
12	24	2	19 100 000	3.5	5 410 765
13	25	2	33 600 000	4.4	7 584 650
14	25	2	16 100 000	3.7	4 363 144
15	20	3	24 300 000	2.3	10 474 138
16	20	3	27 400 000	2.5	11 093 117
17	23	3	21 500 000	2.5	8 600 000
18	23	3	35 600 000	2.7	13 433 962
19	25	3	19 800 000	3.3	6 073 620
20	25	3	20 000 000	3.1	6 430 868

21	23	3	26 800 000	3.3	8 195 719
22	23	3	20 100 000	3.3	6 128 049
23	25	3	16 300 000	4.4	3 704 545
24	25	3	13 600 000	3.6	3 777 778
25	23	3	13 500 000	3.5	3 857 143
26	23	3	24 400 000	3.5	6 971 429
27	25	3	22 400 000	4.2	5 333 333
28	25	3	14 300 000	3.9	3 666 667
29	27	Single-cell RNA- sequencing	/	/	/

Table S2: List of oligonucleotides used for qPCR gene expression analysis

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
B2M	AACGTGGAACAGTCAGACC	AGTAATCTCGATCCCATTTC
CCL2	TTCACCAACAAGACCATCTCA	TGGGTTGTGGAATAAGAGGTCA
CCL20	GTGTGCAGATCCGAAGAAGG	GCTAGACCTTCAATGATGTGCA
CCR5	CAGTGTACACCCGATCCACC	CGTCTTGGGCCCTCTATGAC
CD14	TAGACCTCAGCCACAACCTCG	AGGTTCCAGACATCCCCATC
CD69	AGCAAGTCACGAAGGGTCTC	GAGAACTCACACTGGCTCGG
CD80	TCAAATACGGGGAGCTGTCTG	AGGCCAGGCAGTAGAGAACT
CD86	ACGCAACCATTTACTGTGTCC	CCAGAGCCTTGGTTTTTCCAC
CST3	GAGAGCGAGTACAACAAGGG	CACGTGGTCCGGCCTATC
CXCL10	TCATTCCTGCAAGTCAATCTTGTG	AGACATCTCTTCTCCCCATCC
CXCL8	TGGCTCTCTTGGCAACCTTC	CAGAAGTGCAGCTTCACAAAGAGT
FLT3	GTGGGTGCTTTGTGATTCGC	AGCTTGGTGCATTTCTTGCC
FOXP3	AGGTCTTTGAGGAGCCAGAG	TGTACCACCTCTCTCTGGAGG
GAPDH	AGGTCGGAGTGAACGGATT	ATGGCGACAACATCCACTTT
HCAR2	TCAAGATCAAGAGGGCCATCA	AAGAAGTTGGGGAACGAGGG
IL10	AGAACCACAGTCCAGCCATC	TTTTCACAGGGGAGAAATCG
IL10RA	GAGGTGGGGACGTTCTGCTT	ATGCTGAGGTTGGTTCGAGT
IL13	TGCCTTGGCAGCCTCGTATC	GTGCCATTGCAGAGTGGAGC
IL15	AGGCTGGCATTATGTCTTC	TGCCAGTTGGCTTCTGTTTTAG
IL17A	AAGGCCTTCAGACTACTACAATCGA	CGGTGGAGAGTCCAAGGTGA
IL18	TGTAAGCCTCTCTGTGAAGTGT	TCTTATCTTTCTGTCTGCGAGA
IL1B	CAACAAGTGGTGTCTCCAT	GAGGTGCTGATGTACCACT
IL1RN	GCTCATGGGGAGGTTAAGGG	ATTTACAATGCCGGAGCAC
IL2	TCCAGGATGCTCACATTCAA	GCACTTCTCCAGAGGTTTG
IL27	AAGCTGCTGTCTGAGGTTCTG	TCAAGGACACGTTGGGGAAC
IL2RA	ACGGGTCATCCTACATGCTT	AGGCTCCATTTGACTTTGCA
IL4	GAAGCTGAGCAACTGTCCTG	TCTTGCATGGCGGTCTTTAG
IL6	CTACCGCTTTCCCCACTTCAG	TCCTCAGCTCCTTGATGGTCTC
ITGA1	ACGTCTCTGATGAATTGGCCC	GCACTGAAGCCAGTTTGAGAC
ITGAM	CTTCTCCAAGACTCCCTGAC	TCCCAGGTAAGCATCGGACTC
ITGAX	GATGGCGAAGACTCCTACGG	TGTCACATGTCAGACGCAGG
JCHAIN	AGTGTGTCCGCATCACTTCC	CGGTTCTCAATGGTGAGGTG

LGALS1	GAAGGCGTTTCCCTTCCAGC	TCTCTAGGTTGAGGCGGTTG
LGALS3	AGGGAAGAAAGGCAGACGAC	CAAGTGGGCATCATTGACCG
LGALS9	GAGGACGGGCTTCAGATCAC	GAAGGCAATGTCGTTCTCGC
MKI67	TGGAGTAATCTATGTGGGCCA	CACCAAGAGCCTTTCACCAAA
MYD88	GGATGGTGGTGGTCGTCTC	TTCTTCATGGCCTTGTACTTGA
NOS2	GAACTCTCAGCTCATCCGGT	CACCTCGAGCACAATGTCAG
PGK1	CTAGGCGGAGCTAAAGTTGC	AGCCATTCCACCACCAATAA
PLA2G4A	CGTCAAGCCCAGCTCTCTG	GCACTTCCCCAGACACCCAT
PTGS2	TACGGTGAAAAGTCTCCAC	GAGGTTAGAGAAGGCTTCCCA
PTPRC	TGTCAATGGGAAAGTGCAGC	TGGGAGATGATCACATGCTGG
S100A8	AGGAAATTACCACGCCCTCT	CGGACACGCCTATCTTCACA
S100A9	GAGGACCTGGACACGAACC	GGAGGCTTTATTTTCCCACC
SPRY1	AGGTCCGAAAGGGTGATTG	ACTTGTGCCGTGTTAGGTCC
ST3GAL1	CCCCCARGATCARAGTGAR	TGGAGAAGATGACCGACAGA
ST3GAL2	GGACGGGCACAACCTTCATC	GGCACTCTCAGGGTACATGA
ST3GAL4	CTCTGGTCTGGTCTCATG	AGGCATGGTTCCTTCTTCTCT
TGFB1	CAGTGAAAGACCCACATCTC	GACGCAGGCAGCAATTATCC
TLR2	GATGGATTTTGCCGGAGTCC	TCGTAGCTCTGCAGGTTTGA
TLR3	AGGTGTCCTTGGACTTGAAGC	GTTTCGATAGCTTGCTGAACTGC
TLR4	CATGTCTCAGAACTGCACTTTC	CCACAGCCACTAGTTTCTGC
TLR5	ACCTCGCCCACAACAAGATA	GGGATCTGAATGTTTGGGCC
TNF	GGAGGAAGAGTCCCCAAACAA	ATCTGGGCCACAGGGTTGA
TNFSF13	CACTTCTTACCTTGTCCCA	CCGGGGAATTACGACTCA
TNFSF13B	AGGAAGAAGCGTGCCGTT	AGTACCCGGTTTCTTTGACC
TOP1	GCAGGCAATGAGAAGGAAGA	CACGTA CTCTGACCATCCA

This protocol details the isolation and culture of rabbit cecal *lamina propria* mononuclear cells. It can be completed within 6-7 h, from the isolation to the incubation.

## MATERIALS

- Dissection
- Scissors
- Dissection tweezers
- Laboratory spatula
- Petri dishes
- 40 (Thermofisher n°22363549) and 100 µm cell strainers (Thermofisher n°141378C)
- 15-mL falcon tubes (Sarstedt n°62554502)
- 50-mL falcon tubes (Labcon SuperClear centrifuge tubes n° 3181-325-008-9)
- Pipettor and tips
- Pipette controller
- Serological pipettes
- Counting slides (Ozyme n°CS-050)
- Flat bottomed cell culture plates 96 well (Greiner n°655901)

## EQUIPMENT

- Labcoat and gloves
- Vortex
- Cell culture CO<sub>2</sub> incubator (37°C and 5% CO<sub>2</sub>, Sanyo MCO-18AC)
- Biological safety cabinet
- Laboratory fume hood
- Cell counter (Countess 3 MAN0019566)
- Thermal incubator with rotation unit
- Refrigerated centrifuge with swinging buckets (Hettich UNIVERSAL 320 / 320 R)
- Water bath (VWR 462-0557)
- Biological and chemical waste management equipment

## REAGENTS

- 1X Phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco n°10010-056)
- 10X PBS (Fisher n°10468543)
- 1 x Hank's balanced salt solution HBSS (without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>) (Fisher n°12549069)
- Fetal Bovin Serum (FBS) (Gibco 10270106)
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA 0.5 M) (Invitrogen n°AM9260G)
- Dithiotreitol (DTT 1 M in H<sub>2</sub>O) (Sigma-Aldrich n°43816-10ML)
- Gentamycin (10 mg/mL) (Sigma-Aldrich n°G1272)
- Collagenase D (Roche diagnostics n°11088866001)
- DNase I (Roche diagnostics n°10104159001)
- Dispase II (Roche diagnostics n° D4693-1G)
- Percoll® (Sigma-Aldrich n° GE17-0891-02)
- IMDM GlutaMAX (Gibco n°31980030)
- 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich n°M3148)

## Solutions

**Predigestion solution:** 1 X HBSS (without Ca and Mg) containing 5 mM EDTA and 1 mM DTT  
Prepare a fresh solution just before use and incubate for a few minutes at 37°C

**Digestion solution:** PBS containing 0.12 U/ml Collagenase D, 1 480 U/ml DNase I and 2 U/ml dispase II

Prepare a fresh solution just before use and incubate for a few minutes at 37°C

CRITICAL: The effectiveness of the enzymes may greatly vary between batches; therefore, we strongly recommend testing batches prior and using the same batch for all experiments in the same study.

### **Percoll 100% 1.130 density**

Dilute 2.5 ml of 10X PBS in 22.5 ml of Percoll (Sigma-Aldrich-Aldrich)

### **Percoll 80% 1.10 density**

Dilute 3 ml of 1X PBS in 12 ml of Percoll 100%

### **Percoll 40% 1.05 density**

Dilute 15 ml of 1X PBS in 10 ml of Percoll 100%

**PBS Buffer:** 1X PBS containing 3 % (vol/vol) FBS

Store at 4°C for maximum 1 week

**Complete culture media:** IMDM GlutaMAX, 10% of FBS, 6 µg/mL of Gentamycin and 50 µM 2-mercaptoethanol (Prepare stock solution to a final concentration of 50 mM diluted in 1X PBS)  
**CRITICAL:** 2-mercaptoethanol should be handled under the laboratory fume hood because its vapors are toxic

## 1. TISSUE COLLECTION AND PREPARATION

- 1.1. Euthanize a rabbit according to local protocols and regulations
- 1.2. Using scissors, cut the skin and open the abdomen and carefully remove the cecum by cutting the intestine below the ileocecal junction and above the colon and place it in cold PBS. Store on ice.
- 1.3. Carefully remove mesentery and fat with tweezers. Cut a piece of tissue ( $\approx$  4 g or 5 cm). Open the tissue longitudinally (along the axis of the mesentery) and remove the content by rinsing in cold PBS. If the content is sticky or abundant, remove most of it with a spatula, taking care not to damage the tissue.

**CRITICAL STEP:** Improper removal of fat and mucus can decrease the number of cells isolated

- 1.4. Weight the tissue.

**NOTE:** We recommend using 2 g of tissue per tube for digestion and predigestion steps. The isolated cells can be pooled for the same individual in step 3.4.

- 1.5. Cut the tissue into 1 cm pieces.

## 2. ELIMINATION OF MUCUS, EPITHELIAL CELLS, AND INTRAEPITHELIAL LYMPHOCYTES BY CHEMICAL DIGESTION

- 2.1. Incubate tissue pieces in 5 mL of predigestion solution in 50 mL tubes for 20 minutes at 37°C under slow rotation (40g) in a thermal incubator.
- 2.2. After incubation, shake tubes vigorously for 1 minute. Pass the solution through a 100 µm cell strainer and collect the flow-through in a new 50 mL tube; the flow-through contains epithelial cells and intra-epithelial lymphocytes. These cells can be used for epithelial analyses, otherwise discard the flow-through.
- 2.3. Recover the tissue pieces from the cell strainer and transfer them to a new 50 mL tube and repeat step 2.1 and 2.2.
- 2.4. Recover the tissue pieces from the cell strainer and transfer them in a 50 mL tube containing 10 mL 1 X PBS at 37 °C and incubate for 5 minutes at 37 °C under slow rotation (40g) in a thermal incubator to remove EDTA.
- 2.5. After incubation, shake tube vigorously for 1 minute. Pass the solution through a 100 µm cell strainer and discard the flow through.
- 2.6. Repeat steps 2.4 and 2.5

**CRITICAL STEP:** This washing step is essential to ensure complete removal of EDTA prior to enzymatic digestion. EDTA being a chelating agent, it can remove calcium ions from the solution, which are required for collagenase activity.

2.7. Cut the remaining tissue into 1 mm pieces with dissection scissors.

### **3. LAMINA PROPRIA ENZYMATIC DIGESTION**

3.1. Collect the tissue pieces in 50 mL tubes containing 5 mL digestion solution. Incubate at 37°C for 20 minutes under slow rotation (40 g) in a thermal incubator.

3.2. After incubation, vortex the solution vigorously for 20 seconds in order to favor tissue disruption and pass through a 40 µm cell strainer placed over a 50 mL tube. The flowthrough contains the LPMCs.

NOTE: It is frequent that the cell solution plugs the strainer, try to stir the solution with a tweezer until most of the solution passes through.

3.3. Immediately wash the cells by adding 20 mL of cold PBS with 3% FBS and centrifuge at 500g for 10 minutes at 4°C.

CRITICAL STEP: Prolonged contact of the isolated cells with the enzymes can alter cell viability; thus, prompt cell wash after digestion is essential.

NOTE: Depending on the size and thickness of the tissue, a second incubation in the digestion solution can be necessary in order to isolate all LPMCs. If so repeat steps 3.1 to 3.3 with the remaining tissue.

3.4. Discard the supernatant and resuspend the pellet in 5 mL cold PBS with 3% FBS. Pool samples from the same individual.

3.5. Centrifuge cells at 400g for 5 minutes at room temperature

### **4. PURIFICATION OF LAMINA PROPRIA MONONUCLEAR CELLS IN A PERCOLL DENSITY GRADIENT**

4.1. Discard the supernatant, dry the pellets by pipetting the remaining supernatant and resuspend the pellet in 10 mL of 40% Percoll solution.

4.2. Using a Pipette controller at its lowest speed, carefully overlay the cell suspension on 5 mL of 80% Percoll solution in a 15 mL tube.

CRITICAL STEP: The two Percoll phases must not mix. Tilt the 80 % Percoll solution tube on the side and transfer the cell solution by letting it slowly flow along the inner edge of the tube.

4.3. Centrifuge the Percoll 40/80 gradient for 15 minutes at 1 000g (2 400 rpm) at 20°C without brakes. LPMCs are located in a white ring at the interface between the two Percoll solutions. At the top is a layer of epithelial cells while at the bottom is cell flow and dead cells.

4.4. Using a pipette, carefully collect the LPMCs in a new 50 mL tube and add 20 mL PBS with 3% FBS. Centrifuge at 500g for 5 minutes.

4.5. Remove the supernatant to obtain a dry pellet.

4.6. Immediately resuspend the cells in 10 mL PBS with 3% FBS. Transfer the cell suspensions to a new 15 mL tube

NOTE: Pellets tend to stick better in 15 mL tubes than in 50 mL tubes, thus when multiple centrifugation steps are required, 15 mL tubes should be privileged in order to retain the maximal number of cells.

4.7. Add 10  $\mu\text{l}$  of the cell suspension to the hemocytometer and count the cells. Dilute before count if needed.

## 5. CULTURE OF *LAMINA PROPRIA* MONONUCLEAR CELLS

The following steps are for seeding 96-well culture flat-bottomed plates with  $1 \times 10^5$  cells per well.

5.1. Transfer the required volume of LPMCs cell suspension for culture studies in a new 15 mL Falcon tube and centrifuge 5 minutes at 400g at room temperature.

NOTE: The required volume of cell suspension is calculated as number of cells needed / cells per mL of solution counted at 4.7. We recommend working with a 10 % margin of cells.

5.2. Discard the supernatant, dry the pellet by pipetting the remaining supernatant and resuspend the pellet in Complete culture media to obtain a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL.

5.3. Transfer the cell suspensions to 96-well culture plates with 100  $\mu\text{L}$  per well ( $1 \times 10^5$  cells per well) and incubate in a cell culture  $\text{CO}_2$  incubator ( $37^\circ\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ ).

NOTE: Consistent with the results presented in the corresponding article, in order to induce an immune response, stimulation can be achieved using 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of LPS (LPS E.Coli O111 :B4, Sigma-Aldrich n°L4391) to activate innate immune pathways or 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of PMA ( PMA, Sigma-Aldrich n°5.00582) with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of ionomycin (Sigma-Aldrich n°I9657) to broadly stimulate lymphocytes.

NOTE: In case of RNA extraction, we recommend using the RNeasy plus micro kit (Qiagen n°74034)

**Article 5 : Les oligosaccharides du lait influencent l'immunité de la muqueuse intestinale dans un modèle *in vitro* de lapin allaité, principalement par une voie indirecte, via les métabolites dérivés du microbiote****Article en préparation**

Mathilde Rumeau, Corinne Lencina, Martin Beaumont, Elisabeth Jones, Laurent Cauquil, Sylvie Combes et Christelle Knudsen

**Résumé :**

**Contexte :** Les oligosaccharides du lait de mammifères ont démontré des capacités immunomodulatrices dans l'intestin des nouveau-nés. Ces molécules peuvent interagir directement avec les cellules immunitaires ou servir de prébiotiques pour le microbiote intestinal, entraînant la production de métabolites qui peuvent également moduler la réponse immunitaire. Cette étude vise à examiner *in vitro* la relation fonctionnelle entre la variabilité structurale des oligosaccharides du lait et leurs effets immunomodulateurs directs et indirects sur les cellules mononuclées de la *lamina propria* (LPMCs).

**Résultats :** Les LPMCs ont été isolées du caecum de jeunes lapins et traitées avec trois oligosaccharides du lait structurellement différents (lacto-N-tetraose, 2'-fucosyllactose ou 6'-sialyllactose), ou avec quatre métabolites (isobutyrate, isovalerate, 1,2-propanediol et propionate) dans des conditions basales ou stimulées (PMA-ionomycine ou LPS). L'expression des gènes a été évaluée après 4 et 24 heures de culture afin de déterminer l'immunomodulation. Nos données indiquent que les oligosaccharides du lait ont peu d'effets immunomodulateurs directs, tandis que les métabolites, à l'exception du 1,2-propanediol, modulent fortement les LPMCs. L'isovalerate et le propionate ont notamment montré un double rôle avec des effets pro et anti-inflammatoires. Ces deux métabolites ont d'abord réduit précocement les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL8, l'IL6 et l'IL13, puis ont induit une inflammation après 24 heures de culture. Dans des conditions stimulées par le LPS, ces métabolites pouvaient contrer les effets inflammatoires du LPS en réduisant l'expression d'IL4 et de TNF, tout en augmentant l'IL1B et l'IL6 induites par le LPS.

**Conclusion :** Cette étude démontre que les effets immunomodulateurs des oligosaccharides du lait se produisent principalement de manière indirecte, par le biais des métabolites produits par la consommation de ces oligosaccharides par les bactéries intestinales. Ces résultats soulignent la nécessité d'étudier en détail le rôle immunomodulateur des postbiotiques dérivés de ces oligosaccharides.

**Mots clés :** Oligosaccharides du lait, cellules mononuclées de la *lamina propria*, métabolites bactériens, inflammation, acides gras à chaîne ramifiée

## Milk oligosaccharides shape the gut mucosal immunity in an *in vitro* suckling rabbit model primarily through an indirect pathway, by the microbiota derived metabolites

Mathilde Rumeau<sup>1</sup>, Corinne Lencina<sup>1</sup>, Martin Beaumont<sup>1</sup>, Elisabeth Jones<sup>1</sup>, Laurent Cauquil<sup>1</sup>, Sylvie Combes<sup>1</sup> and Christelle Knudsen<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> *GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, 31326 Castanet-Tolosan, France;*

\*Corresponding author: [christelle.knudsen@inrae.fr](mailto:christelle.knudsen@inrae.fr)

### Abstract

**Background:** Mammalian milk oligosaccharides have demonstrated immunomodulatory capacities in the gut of newborns. These molecules can interact directly with immune cells or serve as prebiotics for the gut microbiota, resulting in the production of metabolites that can also modulate immune response. This study aims to investigate *in vitro* the functional relationship between the structural variability of milk oligosaccharides and their direct and indirect immunomodulatory effects in *lamina propria* mononuclear cells (LPMCs).

**Results:** LPMCs were isolated from the cecum of young rabbits and treated with three structurally different milk oligosaccharides: lacto-N-tetraose, 2'-fucosyllactose or 6'-sialyllactose or with four metabolites: isobutyrate, isovalerate, 1,2-propanediol and propionate in basal or stimulated (PMA-ionomycin or LPS) conditions. Gene expression was assessed after 4 and 24 h of culture to evaluate the immunomodulation at two time points. Our data indicate that milk oligosaccharides have few direct immunomodulatory effects while metabolites, except 1,2-propanediol, highly modulated LPMCs and responses. Particularly, isovalerate and propionate shown a dual role with pro and anti-inflammatory effects. Both exerted an early reduction of pro-inflammatory cytokines such as IL18, IL6 and IL13 while inducing inflammation after 24 h of LPMCs culture. In LPS stimulated conditions, those metabolites could counteract the inflammatory effects of LPS by reducing the expression of IL4 and TNF while also enhancing LPS-induced IL1B and IL6 increase.

**Conclusions:** This study demonstrates that milk oligosaccharides immunomodulatory effects occur mainly indirectly, through the metabolites produced by their consumption by gut bacteria. These findings highlight the need to investigate further the immunomodulatory roles of postbiotic derived from milk oligosaccharides.

**Keywords:** Milk oligosaccharides, *lamina propria* mononuclear cells, bacterial metabolites, inflammation, branched-chain fatty acids

### Introduction

The intestinal mucosa constitutes a critical barrier between the host and the external environment to prevent pathogen invasion while maintaining tolerance to commensals and food antigens (Fiocchi, 2008). This barrier, composed of the microbiota, the gut epithelium and *lamina propria* containing the mucosal immune system, is still immature in neonates making the intestinal environment particularly vulnerable to inflammation and infection (Wagner et al., 2022). Milk oligosaccharides (MOs), the third most abundant component in human milk after lactose and lipids (Xu et al., 2017), are believed to contribute to early

reinforcement of intestinal barrier by supporting the development of all components of the intestinal barrier. MOs are complex glycans composed of six monosaccharide residues, glucose (Glc), galactose (Gal), N-acetylglucosamine (GlcNAc), fucose (Fuc), N-acetylneuraminic acid (NeuAc) and N-glycolylneuraminic acid (NeuGc), the latter being only present in non-human mammalian milk (Mijan et al., 2011; Chen, 2015). MOs are generally categorized into three groups according to their monosaccharide compositions: neutral fucosylated MOs which contain one or more Fuc residue, neutral non-fucosylated MOs that do not contain any Fuc or NeuAc residue and acidic MOs that contain at least one NeuAc which leads to a negatively charged molecule (Chen, 2015).

The digestive enzymes of the host are not able to degrade MOs (Engfer et al., 2000), thus their vast majority reaches the large intestine intact where they have been shown to enhance epithelial barrier integrity (Kuntz et al., 2008; Wu et al., 2019), modulate mucus production (Cheng et al., 2020b), inhibit pathogen adhesion (Coppa et al., 2006; Apostolidis et al., 2011) and influence the composition and activity of the gut microbiota (Ward et al., 2006; Yu et al., 2013; Salli et al., 2021). Moreover, increasing evidence suggests that MOs also directly and indirectly affect immune responses at the mucosal level.

Their immunomodulatory effects occur through both direct interactions with immune cells and indirect mechanisms via the gut microbiota. Directly, MOs can bind to pattern recognition receptors (PRRs) (Kurakevich et al., 2013; Xiao et al., 2019), modulate cytokine production (He et al., 2014), and influence cell activation and differentiation (Xiao et al., 2018). Indirectly, they selectively promote the growth of specific commensal bacteria such as *Bifidobacterium* and *Bacteroides*, which in turn produce microbial metabolites that impact mucosal immunity (James et al., 2019; Šuligoj et al., 2020). Importantly, these effects appear to be structure-specific, as slight variations in MO structure can result in distinct immunological outcomes (Boll et al., 2024). Most of the current literature on MOs and immunity focuses on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). However, this approach overlooks a key physiological aspect: the primary site of MO-immune interactions is the gut, since only 1 to 4 % of MOs might be absorbed in the systemic circulation (Goehring et al., 2014). Moreover, most studies investigate the effects of MOs on isolated immune cell subsets, such as monocytes, dendritic cells or T lymphocytes, while immune responses in the gut are orchestrated by complex cell type interaction networks, rather than isolated immune populations (Newberry and Gustafsson, 2016). In addition to direct effects, microbial metabolites derived from MO fermentation can have immunomodulatory impacts. While data on the most abundant metabolites, the short chain fatty acids (SCFAs), are available, only a limited number of studies have investigated the immunological consequences of other microbial metabolites derived from MO fermentation.

Given the immaturity and sensitivity of rabbits in the postnatal period, this species is particularly relevant for studying the potential immunomodulatory impacts of MOs. We have previously demonstrated that depending on their structure, MOs can be metabolized by suckling rabbit commensal bacteria into distinct metabolites, including acetate, 2-methylbutyrate, isobutyrate, isovalerate, propionate and 1,2-propanediol (Chapter 2, article in revision). Among these metabolites, the branched-chain fatty acids (BCFAs) isobutyrate and

isovalerate, produced from the branched chain amino acids valine and leucine respectively (Smith and Macfarlane, 1997), are particularly understudied in the context of immune regulation. Consequently, to explore these interactions in a physiologically relevant model, we resorted to cecal *lamina propria* mononuclear cells (LPMCs) from suckling rabbits. Together, our experimental framework provides a unique opportunity to examine both the direct and indirect (microbiota-mediated) immunomodulatory roles of structurally distinct MOs and MO-derived metabolites on mucosal immune cells. We show that, MOs only weakly modulate the immune response in a direct manner, but strongly modulate it in an indirect manner, mediated by the microbiota metabolism of these molecules.

## Material and methods

### *Milk oligosaccharides*

To explore the effects of MO structure, we chose to include one representative of each MO type (neutral non fucosylated, neutral fucosylated and acidic MOs). Initial studies analyzing rabbit milk have shown that it is predominantly composed of acidic MOs (relative abundance of 70.8 %), with 6'-sialyllactose (6'-SL) being a key component. Rabbit milk also includes 2.5 % of lacto-N-tetraose (LNT) / lacto-N-neotetraose (LNnT) and 0.9 % of Fucosyllactose (unpublished data). Thus, LNT, 2'-FL and 6'-SL, were chosen for this study and were provided by Inbiose (Zwijnaarde, Belgium). MO stock solutions were obtained by dissolving lyophilized MOs in sterile water (100 mg/ml). Endotoxin and purity levels were provided by the manufacturer and are presented in Table S1.

### *Animals*

21-25 days old male suckling rabbits raised at the IE GenPhySE Sheep and rabbit experimental facility (<https://doi.org/10.17180/ftvh-x393>, Castanet-Tolosan, France) were used for cecal LPMC isolation. The rabbits were killed by electronarcosis followed by an exsanguination. Cecae were carefully dissected, stored full in cold PBS, and processed within 10 minutes after collection. All animal handling was conducted in accordance with the current ethical standards of the European Community (Directive 2010/63/EU), and the French legislation on animal experimentation and ethics. The experimental protocol was approved by the local ethical committee in animal experimentation (CEEA) "Science et santé animaux CEEA-115" under the reference number SSA 2024 006V2. Details about the sampled individuals, including age, body weight and cecum weight are provided in Table S2.

### *Isolation of suckling rabbits' lamina propria mononuclear cells*

Mononuclear cells from the cecal *lamina propria* (LPMCs) were isolated according to a protocol adapted from that described by Weigmann et al. (2007). The cecum was dissected to remove fat and cecal content and cut into 1 cm<sup>2</sup> pieces to favor chemical lysis. Epithelial cells were removed by chemical digestion in Hank's balanced salt solution (HBSS without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>) supplemented with 5 mM of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Invitrogen, Waltham, Massachusetts, United States) and 1 mM of Dithiotreitol (DTT; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, United States) incubated twice for 20 minutes at 37°C under slow rotation (40 g) and filtered out by passing the digestion solution through a 100 µm cell strainer. The tissue

was rinsed twice in PBS at 37°C. Mononuclear cells were then recovered after enzymatic digestion of the *lamina propria* in phosphate buffered saline 1X (PBS; Gibco, Grand Island, New York, United States) supplemented with 0.12 U/ml of Collagenase D (Roche diagnostics, Meylan, France), 1 480 U/ml DNase I (Roche diagnostics) and 2 U/ml of dispase II (Roche diagnostics), incubated for 20 minutes at 37°C under slow rotation (40 g) and filtered by passing the digestion solution through a 40 µm cell strainer. The flowthrough was retrieved, enzymes were removed and cells were rinsed by addition of cold PBS with 3% FBS (Fetal Bovin Serum, Gibco, Grand Island, New York, United States) followed by a 10 min centrifugation at 500 g. LPMCs were then resuspended and isolated in a 40/80% Percoll density gradient (Percoll® density 1.130; Sigma-Aldrich) centrifuged for 15 minutes at 1000 g without breaks. The cells at the density interface were harvested, rinsed in PBS with 3% FBS, and centrifuged at 500 g for 5 minutes. The cell pellet was then resuspended in PBS with 3% FBS and LPMCs were counted with an automated cell counter (Countess 3; Invitrogen).

#### *LPMC culture and treatment*

Isolated LPMCs were cultured in IMDM GlutaMAX (Gibco, Grand Island, New York, United States) supplemented with 10% FBS (Gibco, Grand Island, New York, United States), 50 µM of 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) and 6 µg/ml gentamycin (Sigma-Aldrich). The LPMCs were seeded in flat bottom 96 well plates (Greiner Bio One Bioscience, Frickenhausen, Germany) at a density of 10<sup>5</sup> cells/well (Figure 1). The cells were left unstimulated (basal) or in the presence (stimulated) of Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich) with 1 µg/ml of ionomycin (Sigma-Aldrich) (experiment 1) to stimulate lymphocytes or 1 µg/ml LPS (*E. coli* O111:B4; Sigma-Aldrich) (experiments 2 and 3) to stimulate innate immune and inflammatory responses (Figure 1). Cells were then treated with MOs, i.e., 2 mg/mL of milk oligosaccharides LNT, 2'-FL or 6'-SL (experiments 1 and 2) or treated with 2 mM of metabolites isobutyrate, isovalerate, 1,2-propanediol (Sigma-Aldrich) or propionate (ThermoFisher Scientific, Montigny-Le-Bretonneux, France) (experiment 3) and compared to an untreated control group. The cells were then incubated for 4 h and 24 h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) (Figure 1). After 4h and 24h, cells were collected for RNA extractions. Cell media was removed and centrifuged at 500 g for 5 minutes at 4°C to collect the pellet containing the cells in suspension. Adherent cells were recovered by scraping the wells and Qiagen RLT buffer (RNeasy plus micro kit; Qiagen, Hilden, Germany) was added directly to the wells for lysis. Subsequently, the suspended and adherent cell lysates were combined and homogenized by loading the lysates onto QIAshredder homogenizer columns (QIAshredder; Qiagen) and centrifuged at maximum speed for 2 minutes. The eluates were stored at -80°C until RNA purification.

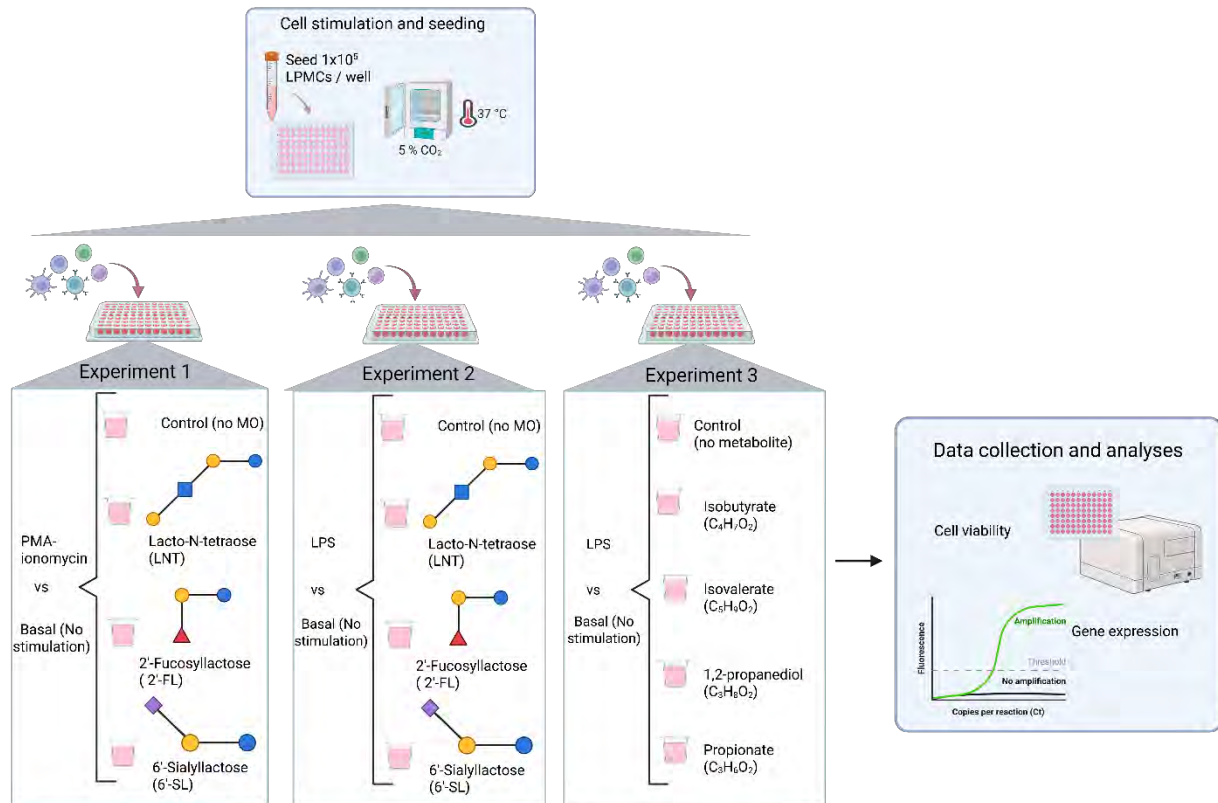


Figure 1: Experimental design for the LPMCs culture and treatment experiments in basal or stimulated conditions using PMA-ionomycin or LPS. PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate, LPS: lipopolysaccharide.

### Cell viability measurements

Cell viability was assessed in duplicate, at 0 h, 4 h and 24 h, with a luminescence method with the CellTiter-glo Reagent<sup>®</sup>. The kit lyses cells leading to adenosine triphosphate (ATP) release by live cells which then reacts with luciferin to emit a light signal proportional to the ATP content. Briefly, 100  $\mu$ l of CellTiter-glo Reagent<sup>®</sup> were added in each well, the plate was shaken for 2 minutes on an orbital plate shaker to induce cell lysis and incubated for 10 minutes at room temperature to stabilize the luminescence. Luminescence was measured for one second per well with a multimode plate reader (Infinite 200 PRO Tecan, Männedorf, Switzerland). The results obtained were first normalized to the culture media and then to cell culture timepoint zero (0 hours,  $10^5$  cells/well). Results were expressed as number of cells per well.

### mRNA isolation and gene expression analysis

Total RNA from the LPMCs in culture was purified with the RNeasy plus micro kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. After an initial homogenization of samples in lysis buffer, a binding of genomic DNA to a gDNA Eliminator spin column was realized to remove contaminating genomic DNA. The flow-through, containing RNA, was then mixed with ethanol and transferred to a silica-membrane spin column to bind RNA. After elution in RNase-free water, the concentration and purity of the extracted RNA were assessed using a NanoDrop spectrophotometer (Nanodrop 8000; ThermoFisher Scientific). When possible, the concentration was adjusted to a final concentration of 20 ng/ $\mu$ l and cDNA was synthesized using the QuantiTect Reverse

Transcription kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. RNA samples were first incubated with a gDNA wipeout Buffer to degrade residual genomic DNA. After heat inactivation, reverse transcription was performed. cDNA were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further analysis. Gene expression evaluation was conducted by the GENTYANE platform (UMR GDEC INRAE/UCA, Clermont-Ferrand, France) using the Biomark™ X system (Standard Bioteools). The obtained gene expression data were visualized using Standard Bioteools Real-Time PCR Analysis Software. Quality controls included the assessment of PCR efficiency using standard curves, melt curve analysis to confirm the specificity of each reaction (single PCR product), and the use of no-template controls to ensure the absence of non-specific amplification. The primer sequences used in this study are presented in Table S3. The mRNA expression levels of each targeted genes were analyzed using the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method. Gene expression levels were first normalized to the geometric mean of the stably expressed reference genes ATP5B and PGK1 in the experiments 1 and 2 and to the stably expressed reference genes B2M and GAPDH for the experiments 1 and 2 in basal conditions after 24 h of culture. In the experiment 3, gene expression levels were normalized to the geometric mean of the stably expressed reference genes HMBS and B2M after 4 h of culture and to HPRT and PGK1 after 24 h of culture in stimulated conditions and to the geometric mean of the stably expressed reference genes ATP5B and PGK1 after 4 h of culture and to B2M and TOP1 after 24 h of culture in basal conditions. Expression levels were then normalized intra-individual and intra-time to the basal control.

### *Statistical analyses*

All data analyses were performed using the R software (v-4.3.2). Gene expression data were log normalized prior to statistical analysis. For cell viability and gene expression a linear mixed effect model was applied to each experiment using the lmer function (R packages lme4) (Bates et al., 2015). For each model type III ANOVA was used to determine the significance of fixed effects (package car). For each model, a post hoc pairwise comparison of means was performed using emmeans package. For each experiment, principal component analyses (PCA) were performed (mixOmics package) on the relative gene expression data (Rohart et al., 2017). In order to evaluate the effect of MOs or metabolites in unstimulated conditions independently at each time point (T4 and T24), log-transformed  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  gene expression data were analyzed using a linear mixed-effects model including treatment as a fixed effect and the rabbit as a random effect. Treatments, corresponding either to different types of MOs (LNT, 2'-FL, or 6'-SL) or microbial metabolites (isobutyrate, isovalerate, 1,2-propanediol, or propionate), were compared pairwise at each time point with the Tukey post-hoc test. For the effect of MOs in basal conditions, given that the experimental conditions were identical, samples from experiments 1 and 2 were combined for analysis. Similarly, in stimulated conditions, comparisons included the stimulated control (no MOs or metabolites), the stimulated treatment groups and the basal control group (neither stimulated nor treated), in order to assess whether MOs or metabolites enhanced or attenuated the immune response induced by stimulation. Each time point was analyzed separately, with treatment as a fixed effect and the rabbit as a random effect.  $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$  Gene expression without log normalization were used for graphical representations.

## Results

### 1. Validation of the model

Cell stimulation was effective and induced the expected responses. PMA activated T lymphocytes while LPS induced a typical pro-inflammatory response, as described in a previous study (article 4, to be submitted). Moreover, time was the main driver of variation (Supplementary figure 1), thus we performed separate analyses for each timepoint.

### 2. Effects of MOs in basal conditions (experiments 1 and 2)

In basal conditions (experiments 1 and 2, n= 15 or 18 rabbits), after 4 h of culture, MOs had no effect on the number of viable cells (Supplementary figure 2A), while after 24 h of culture the number of viable cells decreased with 2'-FL and 6'-SL (p-value < 0.05) compared to basal control (Supplementary figure 2B).

Globally, after 4 h of culture, treatment with MOs significantly affected the expression of 11 % of the 49 genes compared to the basal untreated LPMCs (Table S4). LNT did not alter the expression of any of the genes studied. After 4 h of culture, 2'-FL and 6'-SL moderately upregulated the expression of the anti-inflammatory cytokine IL10 (1.5 and 1.3-fold higher, respectively). However, 2'-FL and 6'-SL also upregulated the expression of the pro-inflammatory cytokines IL6 (1.4-fold higher compared to control) and CXCL8, also known as IL8 (1.3 and 1.4-fold higher, respectively) (Figure 2 and Table S4). Moreover, the expression of TNF- $\alpha$  was 1.6-fold higher when treated with 2'-FL while IL1B expression was 1.7-fold higher compared to untreated cells in 6'-SL-treated LPMCs. The expression of JCHAIN, gene involved in humoral immunity, was downregulated by 2'-FL by 1.25-fold compared to control LPMCs, while 2'-FL also moderately upregulated the expression of T lymphocyte positive co-stimulation molecules CD80 (1.3-fold higher compared to control) expressed on antigen-presenting cells (Figure 2 and Table S4).

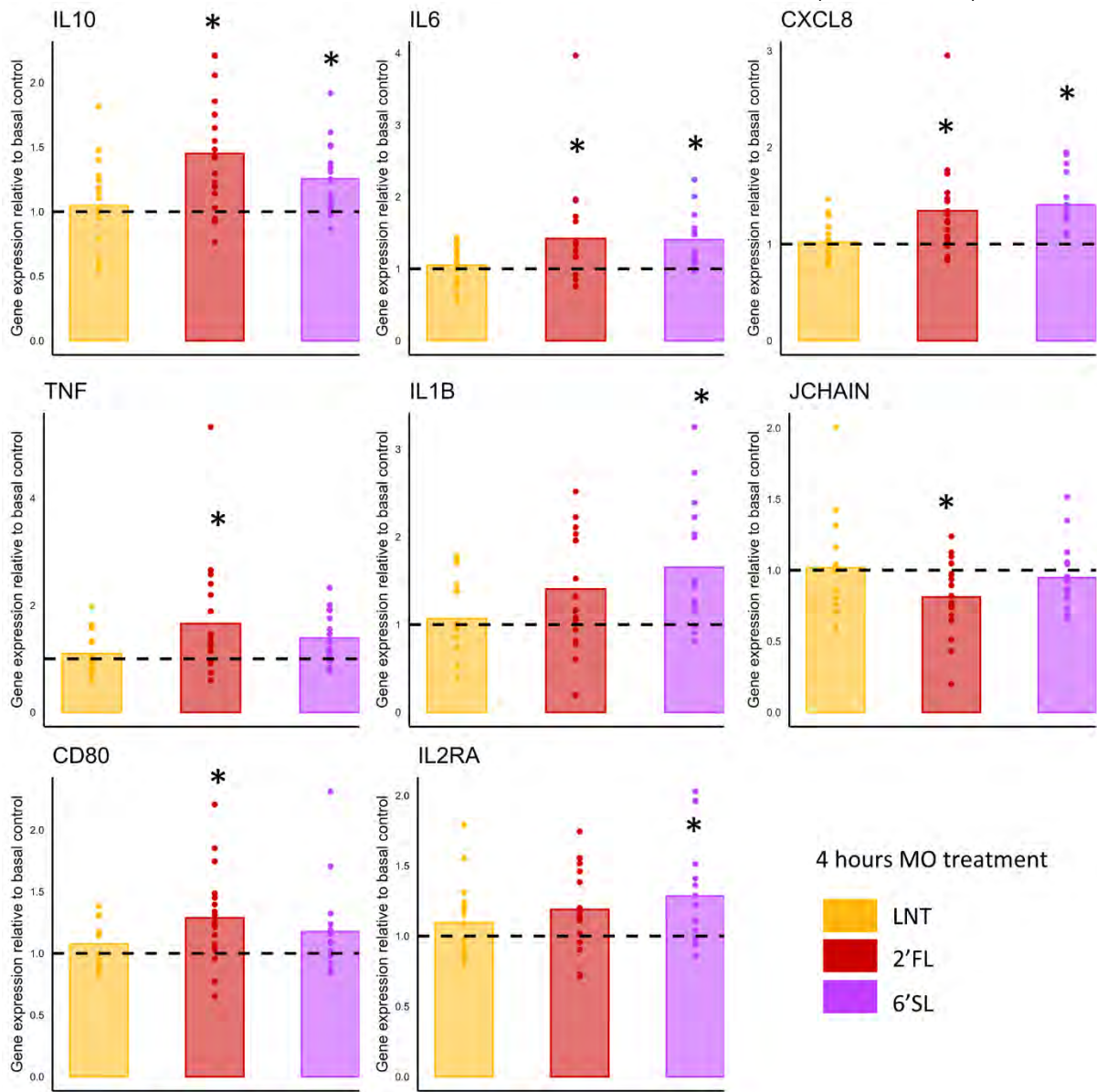


Figure 2: Relative expression of genes in LPMCs derived from suckling rabbit cecum treated with or without MOs in basal conditions for 4 h. Figures represent the expression levels relative to the control ( $n = 18$  rabbits). The dashed line indicates the relative expression of genes in the basal control. \* significantly different from control in basal conditions with  $p < 0.05$ . LNT: lacto-N-tetraose; 2'-FL: 2'-fucosyllactose; 6'-SL: 6'-sialyllactose.

After 24 h of culture, the expressions of 31 % of the 47 genes were significantly regulated by MOs (Table S5). Again, LNT did not alter the expression of any of the genes studied. 2'-FL and 6'-SL significantly upregulated the expression of the pro-inflammatory genes IL6 (2-fold higher), CXCL8, also known as IL8 (1.5 and 1.7-fold higher, respectively) and IL2RA (1.2-fold higher), the receptor CD69 (3.2 and 3.6-fold higher, respectively) and the chemokine receptor CXCL10 (1.8-fold-higher for both MOs) compared to controls (Figure 3 and Table S5). 2'-FL also upregulated the expression of the pro-inflammatory cytokine IL1B (1.4-fold-higher) and the pro-inflammatory protein S100A8 (1.7-fold higher) as well as the anti-inflammatory cytokine IL10 (2.8-fold higher) while downregulating the expression of the chemokine CCL2 and the chemokine receptor CCR5 (1.25-fold less expressed) (Figure 3 and Table S5). Finally, 6'-SL upregulated the expression of the gene HCAR2, encoding for the receptor GPR109A mediating anti-inflammatory responses (2-fold higher) and the PRR TLR3 (1.4-fold higher) (Figure 3 and

Table S5). Given the weak effects observed, the overall immunomodulatory impact of MOs remained modest.

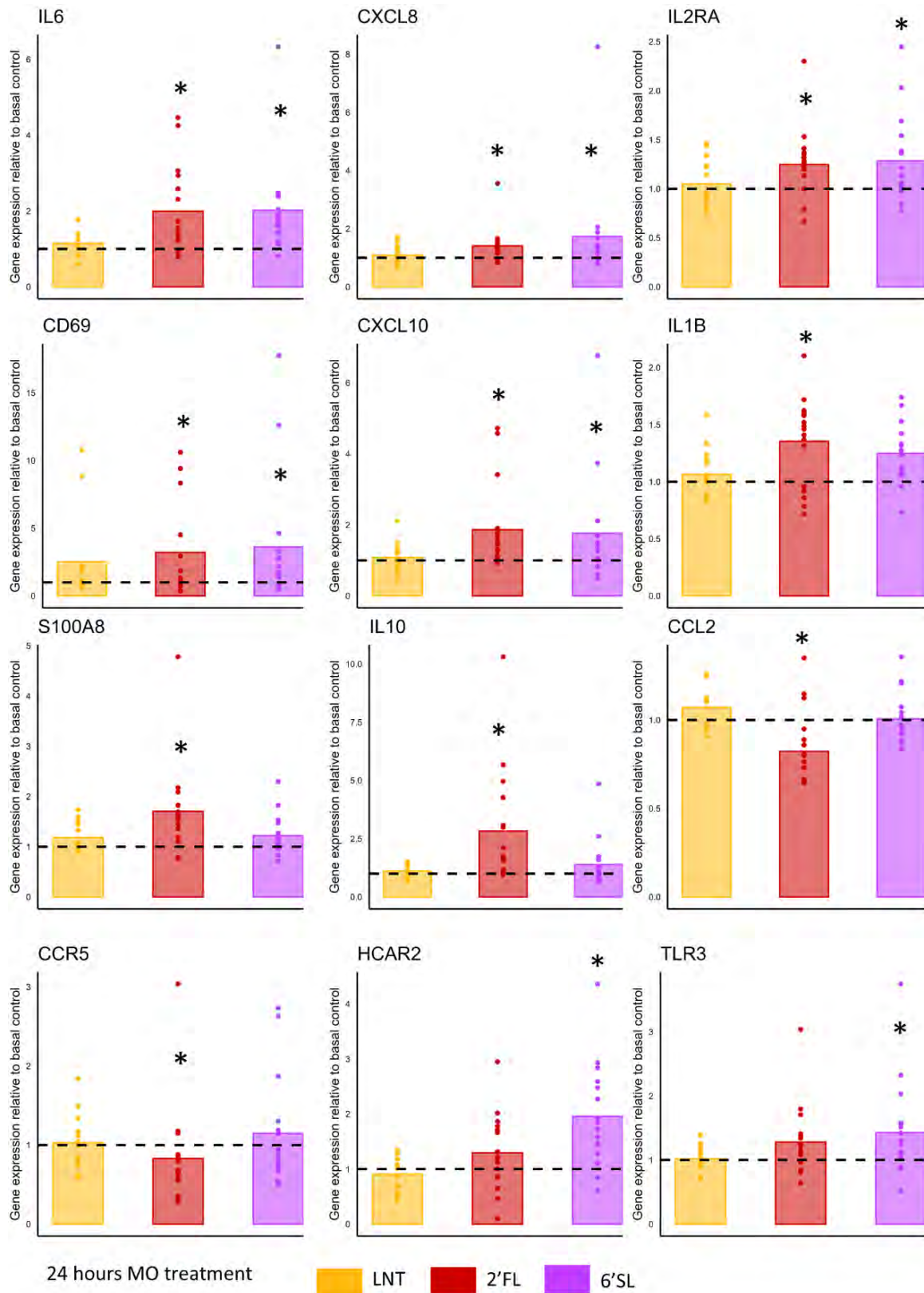


Figure 3: Relative expression of genes in LPMCs derived from suckling rabbit cecum treated with or without MOs in basal conditions for 24 h. Figures represent the expression levels relative to the control ( $n = 18$  rabbits). The dashed line indicates the relative expression of genes in the basal control. \* significantly different from control in basal conditions with  $p < 0.05$ . LNT: lacto-N-tetraose; 2'-FL: 2'-fucosyllactose; 6'-SL: 6'-sialyllactose.

### 3. Effects of MOs in PMA-ionomycin-stimulated LPMCs

We assessed the direct immunomodulatory effect of the three individual MOs on LPMCs stimulated with PMA-ionomycin *in vitro* for 4 or 24 h (experiment 1). After 4 and 24 h of culture, MOs had no effect on the number of viable cells (Supplementary figure 3). The basal control LPMCs (without stimulation and MO treatment) were used to normalize gene expression to detect whether MOs enhanced or reduced the effect of PMA-ionomycin. After 4 h of culture, only 6 genes were found to be differentially expressed according to MO treatment during PMA stimulation (Table S6, Figure 4 and Supplementary figure 4). The upregulation of the expression of CXCL8 by PMA was significantly enhanced in the presence of 6'-SL (Figure 4 and Table S6). The upregulation of the expression of TNF was also significantly higher with 2'-FL and 6'-SL compared to LNT (Figure 4 and Table S6). After 24 h, there was no differences in gene expression between control stimulated LPMCs and MOs-treated stimulated LPMCs (Table S7). The overall immunomodulatory impact of MOs in PMA-ionomycin-stimulated LPMCs remains modest.

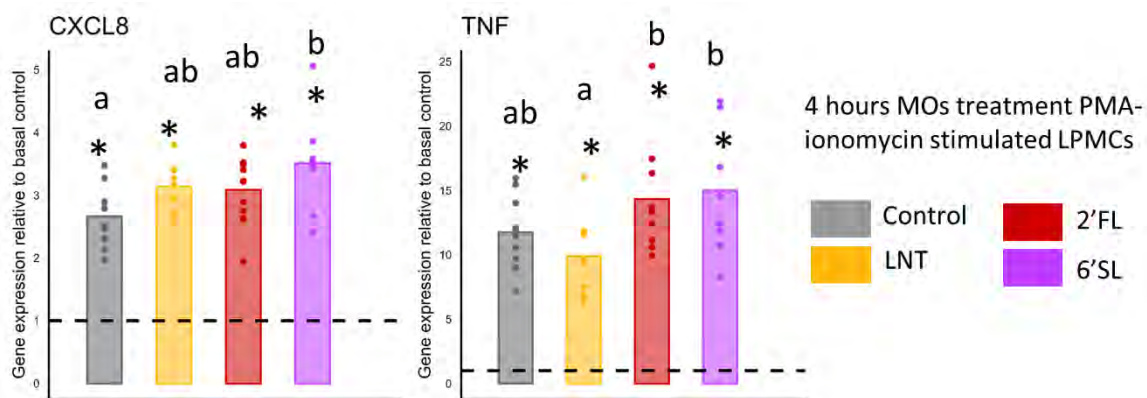


Figure 4: Relative expression of genes in PMA-ionomycin stimulated LPMCs derived from suckling rabbit cecum treated with or without MOs in stimulated conditions for 4 h. Figures represent the expression levels relative to the control ( $n = 10$  rabbits). The dashed line indicates the relative expression of genes in the basal control. \* significantly different from control in basal conditions with  $p < 0.05$ . Mean values with a different superscript differ ( $p < 0.05$ ). LNT: lacto-N-tetraose; 2'-FL: 2'-fucosyllactose; 6'-SL: 6'-sialyllactose. PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate.

### 4. Effects of MOs in LPS-stimulated LPMCs

We assessed the direct immunomodulatory effect of three individual MOs, LNT, 2'-FL or 6'-SL, on LPMCs *in vitro* for 4 or 24 h stimulated with LPS (experiment 2). After 4 and 24 h of culture, MOs had no effect on the number of viable cells (Supplementary figure 5). The basal control LPMCs (without stimulation and MO treatment) were added to the statistical model to detect whether MOs enhanced or reduced the effect of LPS. After 4 h of culture, only 4 genes were found to be differentially expressed according to MOs during LPS stimulation (Table S8, Figure 5 and Supplementary figure 6). TNF was significantly upregulated in all LPS-stimulated LPMCs treatments (1.5, 1.7, 2 and 2.4-fold higher for control, LNT, 2'-FL and 6'-SL, respectively). Solely 6'-SL was significantly different compared to control stimulated LPMCs, thus enhancing the effect of LPS. After 24 h, there were no differences in gene expression between control stimulated LPMCs and MOs-treated stimulated LPMCs (Table S9). The overall immunomodulatory impact of MOs in LPS-stimulated LPMCs remained modest.

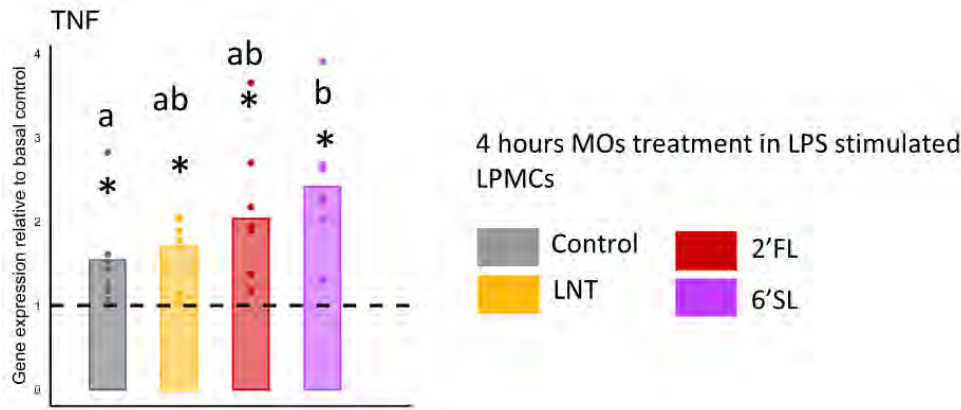


Figure 5: Relative expression of genes in LPS stimulated LPMCs derived from suckling rabbit cecum treated with or without MOs in stimulated conditions for 4 h. Figures represent the expression levels relative to the control ( $n = 8$  rabbits). The dashed line indicates the relative expression of genes in the basal control. \* significantly different from control in basal conditions with  $p < 0.05$ . Mean values with a different superscript differ ( $p < 0.05$ ). LNT: lacto-N-tetraose; 2'-FL: 2'-fucosyllactose; 6'-SL: 6'-sialyllactose. LPS: lipopolysaccharides.

### 5. Indirect effects of MOs in LPMCs

Finally, the indirect immunomodulatory effects of MOs were assessed using isobutyrate, isovalerate, 1,2-propanediol and propionate, which are known to be produced following the bacterial metabolism of MOs (experiment 3). The metabolites were added to LPMCs with or without LPS activation *in vitro* for either 4 or 24 h. In unstimulated cells, after 4 h of culture the number of viable cells increased with isobutyrate and isovalerate ( $p$ -value  $< 0.05$ ) compared to control (Supplementary figure 7A), while after 24 h of culture, metabolites had no effect on the number of viable cells (Supplementary figure 7B). In LPS-stimulated cells, after 4 h of culture metabolites had no effect on the number of viable cells (Supplementary figure 8A), while after 24 h the number of viable cells increased with 1,2-propanediol ( $p$ -value  $< 0.05$ ) compared to control (Supplementary figure 8B). We analyzed the expression of 50 genes coding for markers of the main gut immune functions and cell populations. In unstimulated LPMCs, metabolite addition had an effect on 68 % and 64 % of the genes after 4 and 24 h of culture, respectively (Table S10 and Table S11), while in LPS-stimulated LPMCs, metabolite addition had an effect on 33 % of the genes after 4 and 24 h of culture (Table S12 and Table S13).

#### *Isobutyrate, isovalerate and propionate modulate the activation and recruitment of innate immune cells*

Markers associated with the activation and recruitment of innate immune cells were significantly modulated by metabolite treatments, especially isovalerate and propionate. After 4 h of culture, isovalerate and propionate upregulated the expression of CCR5 (2.6 and 2.2-fold higher compared to control LPMCs, respectively) in unstimulated LPMCs (Figure 6A). Isovalerate weakly upregulated the expression of CD86 (1.2-fold higher) after 4 h of culture (Figure 6A). After 24 h of culture, CD86 and CD80 were weakly upregulated by isobutyrate, isovalerate and propionate (CD86 1.7, 2.2 and 2-fold higher, respectively, and CD80 1.6, 2.2 and 2-fold higher, respectively, Figure 7A) in unstimulated LPMCs. After 24 h isovalerate also upregulated the expression of CD69 (3-fold higher) (Figure 7A). Similarly, in stimulated conditions, after 4 h of culture, the upregulation of the expression of CD69 was significantly

higher with isovalerate (2.4-fold higher while it was 1.6-fold higher in untreated stimulated cells) (Figure 8A). After 4 h of culture, propionate downregulated the expression of the receptor IL2RA (1.4-fold lower), compared to basal LPMCs (Figure 6A). In LPS-stimulated LPMCs the upregulation of the expression of IL2RA by LPS (2-fold higher) was slightly reduced by isovalerate and propionate (1.4-fold higher) after 24 h of culture (Figure 9A). The expression of ITGAM, also known as CD11b, a myeloid activation marker, was significantly increased after 24 h of culture following exposure of unstimulated cells to propionate (2.6-fold higher, Figure 7A). In LPS-stimulated conditions, the downregulation of ITGAM, induced by LPS (4-fold lower than basal LPMCs) was mitigated following exposure to propionate (1.1-fold lower compared to basal LPMCs, Figure 9A). MKI67, marker of cell proliferation was downregulated after 4 h of culture by isovalerate and propionate in basal LPMCs (1.67 and 2-fold lower, respectively, Figure 6A). LPS downregulated the expression of the receptor CD14 (1.9-fold lower compared to basal LPMCs) and the addition of isovalerate or propionate limited this effect, resulting in the same expression levels as in basal LPMCs after 4 hours of culture (Figure 8A). The expression of ITGA1, that plays a role in cell adhesion and migration was slightly downregulated by isovalerate and propionate (1.25 and 1.4-fold lower, Figure 6A) after 4 h of culture. This suggests that propionate may counteract the suppressive effect of LPS on ITGAM expression. In addition, both propionate and isovalerate may counteract the LPS-induced downregulation of the CD14 receptor.

#### *Metabolites modulate pro-inflammatory cytokines and inflammatory mediators*

The metabolites, with the exception of 1,2-propanediol, showed a capacity to induce a pro-inflammatory response. Isovalerate upregulated the expression of TNF, also known as TNF- $\alpha$ , after 24 h of culture (1.8-fold higher than basal LPMCs, Figure 7B). TNF was also upregulated in LPS-stimulated conditions; however, propionate slightly reduced this LPS-induced upregulation (3.8-fold higher vs 2.2-fold higher, respectively, Figure 9B). Expression of IL6 was significantly downregulated by isovalerate and propionate after 4 h of culture (1.6-fold lower, Figure 6B) while it was significantly upregulated after 24 h of culture by isobutyrate (1.8-fold higher), propionate (1.9-fold higher) and isovalerate (2.7-fold higher) compared to basal LPMCs (Figure 7B). In stimulated conditions, isovalerate enhanced the LPS-upregulation of IL6 expression after 4 h of culture (3.3-fold higher compared to 2-fold higher in LPS-stimulated LPMCs, Figure 8B). At 24 h, isobutyrate, isovalerate and propionate upregulated the expression of the pro-inflammatory cytokine IL1B (1.67, 2.9 and 2.3-fold higher compared to control, respectively, Figure 7B). Similarly, in stimulated conditions, propionate enhanced the LPS-induced upregulation of IL1B expression after 24 h of culture (3.4-fold higher compared to 2.2-fold higher in LPS stimulated LPMCs) (Figure 9B). After 4 h of culture, propionate slightly downregulated PLA2G4A (1.4-fold lower, Figure 6B) and isovalerate and propionate downregulated S100A9 (1.4 and 1.6-fold lower, respectively, Figure 6B). After 24 h of culture, isovalerate and propionate upregulated PLA2G4A (2-fold higher for both metabolites), S100A8 (3 and 2.4-fold higher, respectively) and S100A9 (3 and 2.7-fold higher, respectively) (Figure 7B). PTGS2, also known as COX2, an enzyme central to inflammation, was slightly upregulated by isobutyrate after 4 h (1.2-fold higher, Figure 6B) and after 24 h by isobutyrate, isovalerate and propionate (1.6, 2.3 and 2.1-fold higher compared to control, respectively, Figure 7B). After 24 h of culture, in LPS-stimulated conditions, isobutyrate, isovalerate and propionate

enhanced the upregulation of PTGS2 induced by LPS (2 to 2.5-fold higher with metabolites while 1.5-fold higher with LPS-stimulated untreated LPMCs) (Figure 9B).

*Metabolites modulate pattern recognition receptors and chemokine signaling.*

The expression of CXCL10, a chemokine involved in Th1 recruitment, was significantly downregulated by isobutyrate, isovalerate and propionate after 4 h in basal conditions (2.3, 3 and 6-fold lower respectively, Figure 6C). Propionate also downregulated the expression of the chemokine CCL2 after 4 and 24 h of culture (1.6 and 1.7-fold lower, respectively, Figure 6C and 7C). Additionally, after 4 h of culture, isobutyrate, isovalerate and propionate downregulated the expression of TLR3 (1.7, 2.3 and 3.3-fold less expressed compared to basal LPMCs, respectively) and TLR4 (1.7, 2.2 and 3-fold lower, respectively, Figure 6D) but also after 24 h of culture for TLR3 (1.6, 2 and 2.5-fold lower expressed compared to basal LPMCs, respectively) and TLR4 (1.4, 1.6 and 1.6-fold lower, respectively) (Figure 7D). In stimulated-LPMCs, LPS alone downregulated TLR4 (2-fold lower) after 24 h of culture. This downregulation was enhanced by isovalerate (Figure 9C). In contrast, in basal LPMCs, expression of TLR5 was highly upregulated at 24 h by isovalerate and propionate (4.6 and 5-fold higher, respectively) (Figure 7D). Finally, the expression of HCAR2, the gene encoding for the receptor GPR109A, was upregulated at 24 h in basal LPMCs culture by isobutyrate (2-fold higher, Figure 7D).

*Modulation of anti-inflammatory and regulatory pathways*

Exposure of LPMCs to metabolites impacted key regulators of immune function. IL1RN, a key anti-inflammatory cytokine antagonist was downregulated by isovalerate and propionate (1.52-fold lower, Figure 6E) after 4 h of culture, while it was upregulated by isobutyrate and propionate (2-fold higher) after 24 h of culture (Figure 7E). In LPS-stimulated LPMCs, the downregulation of IL1RN induced by LPS (2.5-fold lower) was counteracted by isobutyrate, isovalerate and propionate after 24 h of culture (Figure 9D). After 4 h of culture, propionate downregulated the expression of the pro-inflammatory cytokines IL13 (1.6-fold lower), IL4 (2-fold lower) and IL18 (2-fold lower) (Figure 6B). In stimulated LPMCs, after 4 h of culture, isovalerate limited the upregulation of IL4 induced by LPS (3-fold higher compared to basal LPMCs), with an expression level similar to basal control conditions (Figure 8B). Similarly, IL10RA, receptor of the anti-inflammatory cytokine IL10 was upregulated by isovalerate (3.5-fold higher) after 24 h of culture (Figure 7E). However, propionate also downregulated the expression of the anti-inflammatory cytokines TGFB1 (1.6-fold lower) and IL10 (1.4-fold lower) after 4 h of culture (Figure 6E). In LPS-stimulated conditions, IL10 was upregulated after 24 h of culture by LPS, however isovalerate and propionate partially inhibited this upregulation (3-fold higher with both metabolites compared to 10-fold higher with LPS, Figure 9D). Conversely, isovalerate and propionate slightly downregulated the dendritic cell marker CST3 (1.3-fold lower, Figure 6E) after 4 h of culture while they upregulated this marker after 24 h of culture (1.9 and 1.7-fold higher, respectively, Figure 7E). In LPS-stimulated LPMCs, expression of CST3, which was downregulated by LPS (1.25-fold lower compared to basal), was maintained at basal control levels following 24 h of treatment with isovalerate and propionate (Figure 9D). In unstimulated conditions, isovalerate and propionate upregulated LGALS1 (2-fold higher for both metabolites compared to basal LPMCs) and LGALS3 (3.4 and 2.8-fold

higher, respectively), involved in immune regulation and tissue repair, after 24 h of culture (Figure 7E) while LGALS9, another galectin, was downregulated by these two metabolites (1.4 and 1.6-fold lower expressed) after 4 h of culture (Figure 6E). SPRY, a negative regulator of inflammatory signaling, was downregulated early in culture with isovalerate and propionate (1.49 and 1.71-fold lower, respectively, Figure 6E) and upregulated at 24 h by isovalerate and propionate (2-fold higher, Figure 7E). Finally, ST3GAL4, was slightly upregulated by isovalerate and propionate after 24 h of culture (1.8-fold higher, Figure 7E).

#### *Role of metabolites in adaptive immunity*

FOXP3, a key transcription factor in regulatory T cells was downregulated by isovalerate and propionate after 4 h of culture (2.2 and 3-fold lower, respectively, Figure 6F). Finally, TNFSF13, also known as APRIL, involved in B cell survival and mucosal immunity, was significantly upregulated by isovalerate after 24 h (3-fold higher, Figure 7F).

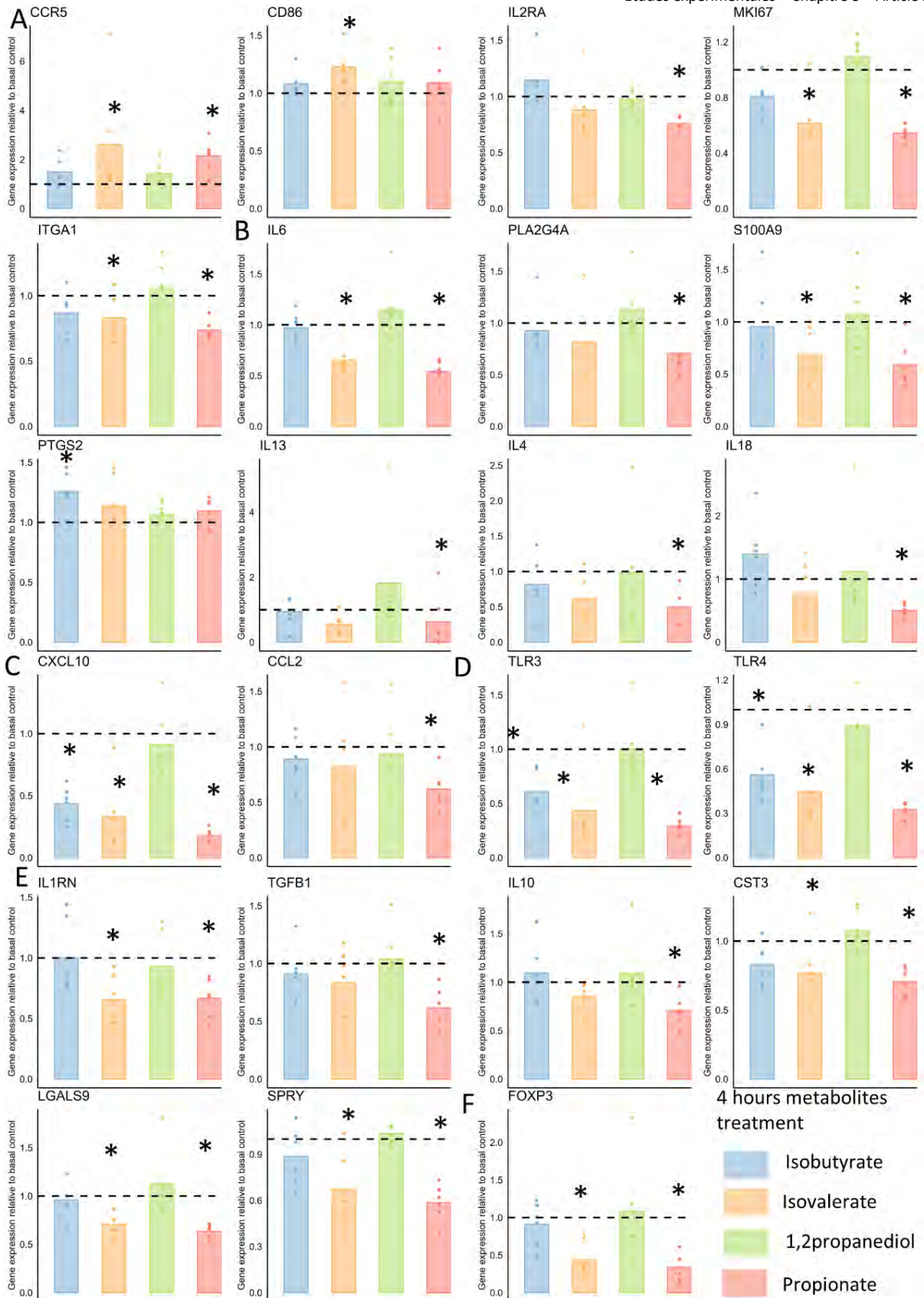


Figure 6: Relative expression of genes coding for (A) activation and recruitment, (B) pro-inflammatory cytokines and mediators, (C) chemotaxis, (D) PRR and signaling (E) anti-inflammatory and immunoregulation and (F) adaptive immunity in LPMCs derived from suckling rabbit cecum treated with or without metabolites in basal conditions for 4 h. Figures represent the expression levels relative to the control (n = 6 rabbits). The dashed line indicates the relative expression of genes in the basal control. \* significantly different from control in basal conditions with  $p < 0.05$ .

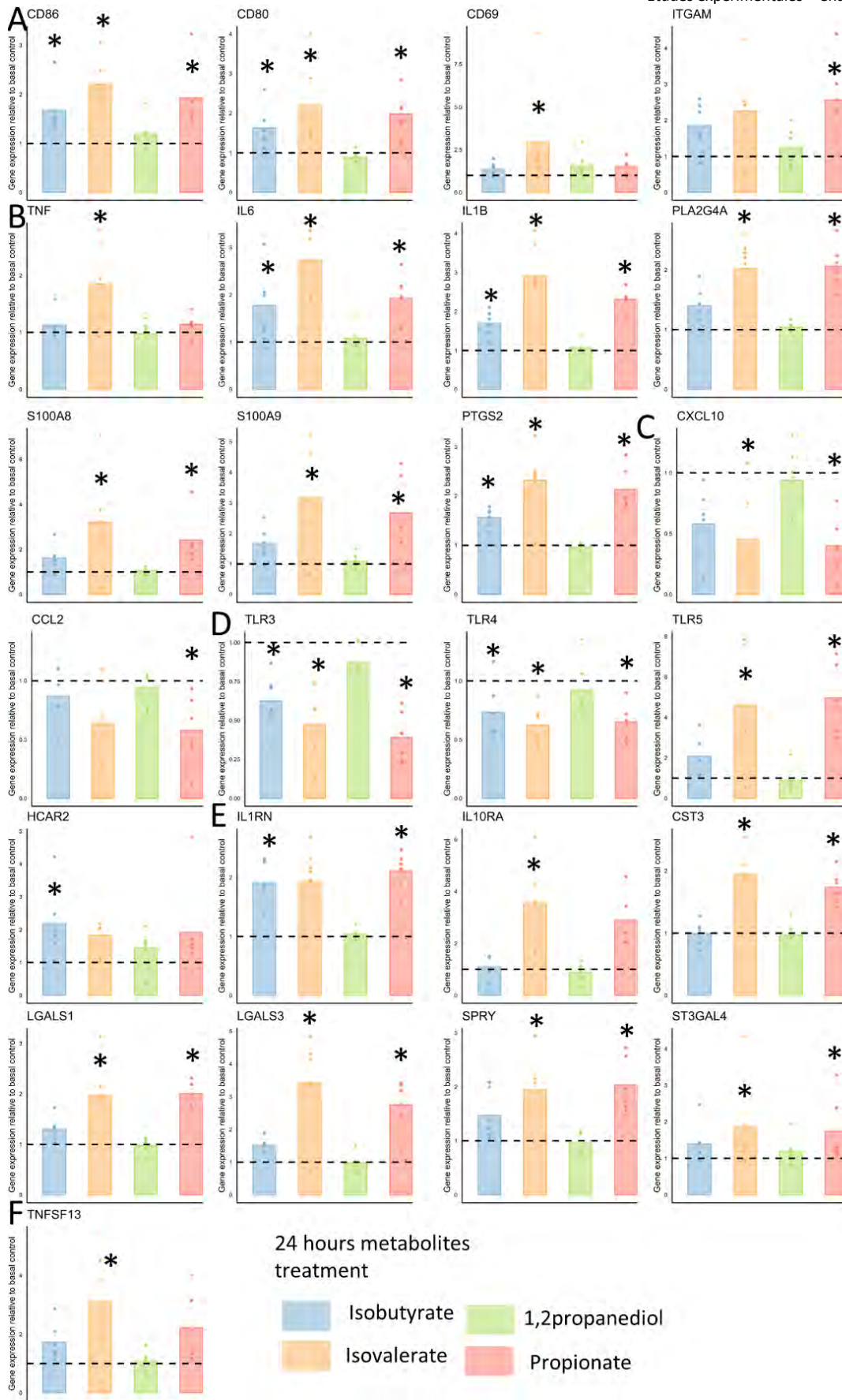


Figure 7: Relative expression of genes coding for (A) activation and recruitment, (B) pro-inflammatory cytokines and mediators and (C) chemotaxis, (D) PRR and signalization, (E) anti-inflammatory and immunoregulation and (F) adaptive immunity in LPMCs derived from suckling rabbit cecum treated with or without metabolites in basal conditions for 24 h. Figures represent the expression levels relative to the control (n = 6 rabbits). The dashed line indicates the relative expression of genes in the basal control. \* significantly different from control in basal conditions with p < 0.05.

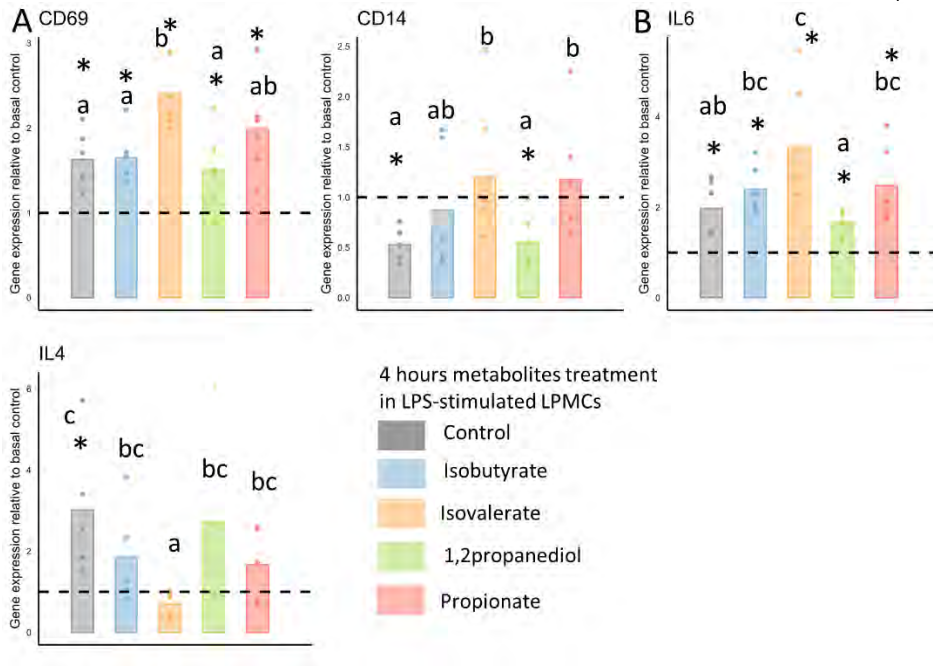


Figure 8: Relative expression of genes coding for (A) activation and recruitment and (B) pro-inflammatory cytokines in LPS stimulated LPMCs derived from suckling rabbit cecum treated with or without metabolites in stimulated conditions for 4 h. Figures represent the expression levels relative to the control (n = 6 rabbits). The dashed line indicates the relative expression of genes in the basal control. \* significantly different from control in basal conditions with  $p < 0.05$ . Mean values with a different superscript differ ( $p < 0.05$ ). LPS: lipopolysaccharides.

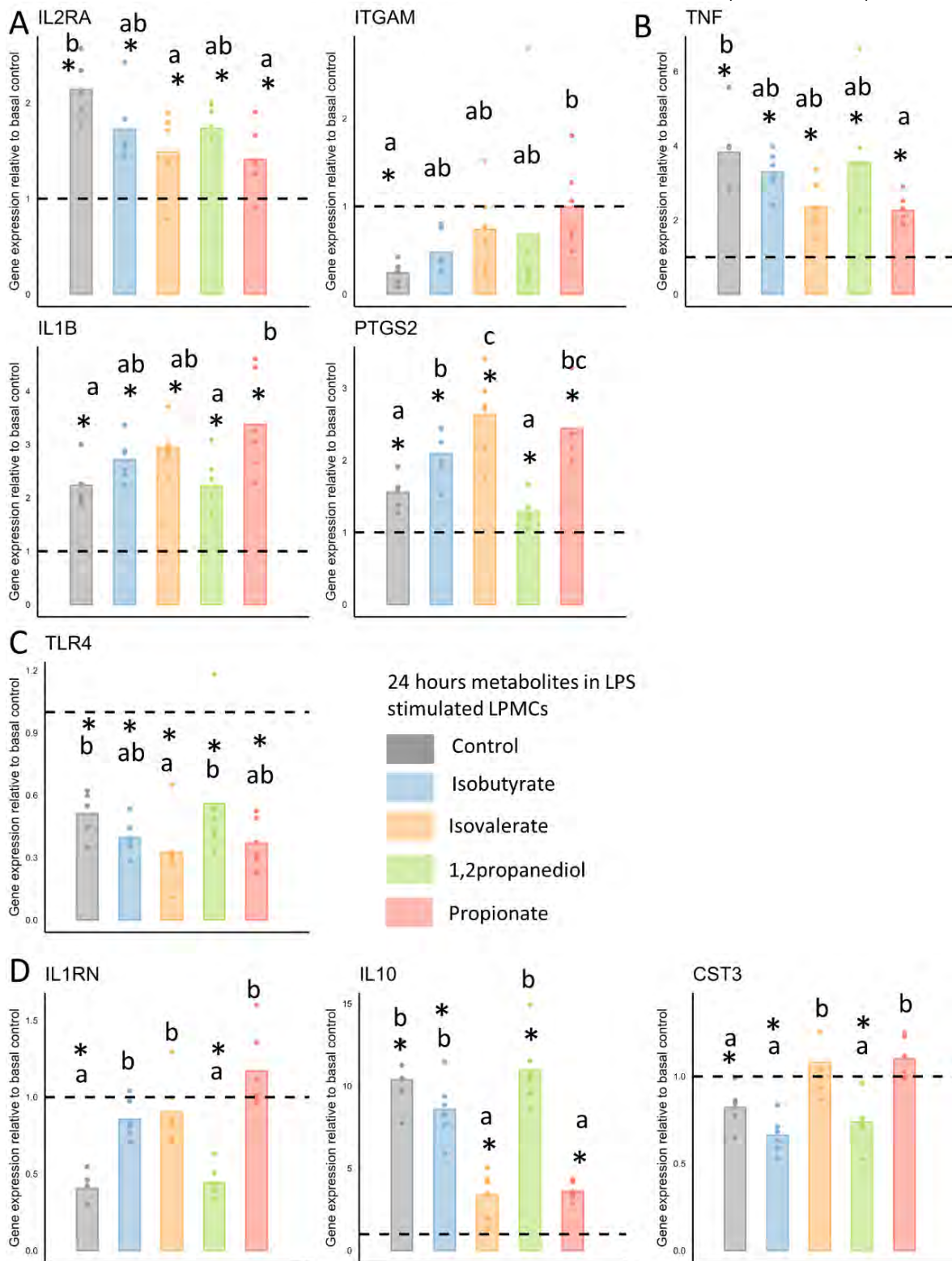


Figure 9: Relative expression of genes coding for (A) activation and recruitment, (B) pro-inflammatory cytokines, (C) PRR and signaling and (D) anti-inflammatory and immunoregulation in LPS stimulated LPMCs derived from suckling rabbit cecum treated with or without metabolites in stimulated conditions for 24 h. Figures represent the expression levels relative to the control (n = 6 rabbits). The dashed line indicates the relative expression of genes in the basal control. \* significantly different from control in basal conditions with  $p < 0.05$ . Mean values with a different superscript differ ( $p < 0.05$ ). LPS: lipopolysaccharides.

## Discussion

MOs support the maturation of the intestinal immune system both directly and indirectly, through their interactions with the microbial community. In this study we investigated the direct immunomodulatory effects of three structurally distinct MOs - LNT, 2'-FL and 6'-SL and the indirect effects of MOs-derived metabolites on *lamina propria* mononuclear cells isolated from suckling rabbits.

In our study, only a limited number of genes were significantly modulated by each of the three MOs in basal conditions, and even less in the presence of PMA-ionomycin or LPS. Our results indicate that both 2'-FL and 6'-SL weakly increased the expression of IL10, and in parallel, 2'-FL reduced the expression of CCL2, a chemokine associated with monocyte recruitment (Shi and Pamer, 2011) and the chemokine CCR5. These effects support a possible limitation of immune cell recruitment by 2'-FL and 6'-SL even in the absence of microbial signals. A similar IL10 induction has been observed in porcine PBMCs treated with 2'-FL (Comstock et al., 2014), and in RAW264.7 macrophages (Zhang et al., 2019). Other studies have however shown a suppressive role of MOs on innate inflammatory responses with a mixture of MOs that inhibited LPS-induced pro-inflammatory cytokine production, such as IL6, TNF- $\alpha$  and surface marker expressions of CD40, CD80 and CD86 in human monocyte-derived dendritic cells (Xiao et al., 2019). In contrast, in our studies, we observed that both 2'-FL and 6'-SL increased the expression of pro-inflammatory cytokines IL1B, IL6, CXCL8, TNF in basal cells and MOs tended to enhance the effect of stimulation rather than reducing them. This supports previous findings where acidic MOs promoted IFN $\gamma$  expression in cord blood mononuclear cells (Eiwegger et al., 2004) and increased IL4, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production in dendritic cells and macrophages exposed to fucosylated MOs such as lacto-N-fucopentaose III, containing the Lewis X motif (Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc), *in vitro* (Thomas et al., 2003; Atochina and Harn, 2005). Moreover, the upregulation of CD69 at 24 h in unstimulated LPMCs treated with 2'-FL and 6'-SL suggests that MOs can prime immune cells, a result in line with previous observations of increased CD69 production in dendritic cells and macrophages exposed to fucosylated MOs *in vitro* (Thomas et al., 2003; Atochina and Harn, 2005). Additionally, a mixture of MOs isolated from human enhanced the antigen-presenting capacity of dendritic cells as illustrated by the upregulation of the expression of costimulatory molecules CD80 and CD86, and promoted T-cell activation, suggesting role in bridging innate and adaptive immunity (Xiao et al., 2019). Interestingly, this dual behavior is consistent with previous observations. A mixture of MOs induced the production of IL1B, IL6 but also IL10 in unstimulated macrophage cell line RAW264.7 (Zhang et al., 2019). Additionally, 6'-SL increased the expression of pro-inflammatory cytokines IL6, TNF, also known as TNF- $\alpha$ , and IL1B and the anti-inflammatory cytokine IL10 in human PBMC-derived dendritic cells stimulated with LPS, while 2'-FL and LNT had limited or no effects (Boll et al., 2024). Finally, regardless of the stimulation conditions, LNT had no significant effects, showing no modulation of inflammatory genes compared to 2'-FL and 6'-SL, which is consistent with the results of Boll et al. (2024).

Several studies suggest that MOs are drivers of specific polarization of T lymphocytes towards the T helper 1 phenotype as described in PBMC experiments (Xiao et al., 2019; Ayechu-

Muruzabal et al., 2020; Boll et al., 2024). Although MOs slightly modulated several immune-related genes in LPMCs, we did not observe a polarization towards Th1 or Th2 phenotypes, since markers of T helper subsets, such as IFN $\gamma$ , IL4 or IL13, were not significantly modulated by any of the tested MOs under our experimental conditions. Similarly, although MOs have been shown to promote B cell survival and differentiation *in vivo* in the spleen and mesenteric lymph node of orally supplemented mice (Rosa et al., 2022), we did not detect changes in TNFSF13 and TNFSF13B expression and solely a slight downregulation of JCHAIN expression by 2'-FL in LPMCs, suggesting that MO-driven B cell modulations may be tissue specific. Divergent findings across species (human, murine, porcine), cell types (PBMCs, LPMCs, isolated cells), stimulation protocols and MO combinations also arise.

In some contexts, MOs have also been shown to bind to TLR4, potentially inhibiting LPS signaling (Kurakevich et al., 2013). However, in our study, MOs did not significantly modulate the expression of Galectin-1, -3 or -9, nor of TLR3, TLR4 or TLR5, despite these receptors being known to interact with various MOs (Shams-Ud-Doha et al., 2017; Cheng et al., 2019). This suggests that other pathways may mediate the observed effects. These could involve alternative receptors or intracellular signaling cascades not captured in our gene panel.

MOs could also exert indirect immunomodulatory effects by promoting the production of bacterial metabolites (Borewicz et al., 2019; Šuligoj et al., 2020; Bosheva et al., 2022) as we recently demonstrated with *in vitro* fermentation of MOs by suckling rabbit commensal bacteria inducing the production of the propionate precursor 1,2-propanediol and BCFAs isovalerate, isobutyrate (Chapter 2, article in revision). Our findings indicate that microbial metabolites derived from MO fermentation, particularly propionate and isovalerate, exert pleiotropic effects on gut immune cells. These metabolites not only stimulate immune activation but also participate in immune regulation, highlighting their dual role in mucosal immunity. Propionate and isovalerate significantly increased the expression of pro-inflammatory mediators including IL1B, TNF, IL6, IL18 as well as PTGS2 (COX2), PLA2G4A and S100A8/9. This pro-inflammatory effect, under basal and stimulated conditions, indicates that these metabolites amplified LPS inflammatory effects and can prime mucosal immunity even in the absence of external stimuli. The enhancement of pro-inflammatory responses by propionate is supported by studies showing that this metabolite can enhance TNF (TNF- $\alpha$ ), expression in HT-29 cells (Lin et al., 2015). Likewise, isovalerate can induce pro-inflammatory cytokine IL1B and IL23 production in PBMCs under LPS stimulation (Xie et al., 2025). Isovalerate and propionate also downregulated IL10 expression in LPS-stimulated conditions, which is supported by a study demonstrating that both isovalerate and isobutyrate inhibited the LPS-induced IL10 production in PBMCs (Xie et al., 2025). All metabolites, except 1,2-propanediol, consistently downregulated TLR3 and TLR4, suggesting a potential dampening of LPS recognition pathways. In contrast, TLR5 was upregulated, implying a selective tuning towards flagellin recognition. This selective modulation of pattern recognition receptors (PRR) may help balance microbial surveillance and immune tolerance. Propionate has previously been shown to fine-tune immune activation under LPS stimulation by sustaining antigen-presenting cell activity while limiting excessive TLR4-driven inflammation (Park et al., 2015). Similarly, the downregulation of TLR4 by isobutyrate has been demonstrated in a pig model, accompanied by a downregulation of TNF- $\alpha$  (Fang et al., 2025).

Alongside their pro-inflammatory effects, metabolites also induced anti-inflammatory and regulatory markers. Notably, IL10RA and IL1RN were upregulated by isovalerate, isobutyrate and propionate suggesting a negative feedback loop to limit inflammation. The induction of LGALS1 and LGALS3, known for tissue remodeling and immune regulation, by propionate and isovalerate supports a role in mucosal repair. Notably, propionate has already been shown to upregulate the expression of mucosal lectins, such as Reg3 family members, in a murine model of colitis contributing to epithelial homeostasis (Bajic et al., 2020). Further, the upregulation of SPRY and HCAR2 (GPR109A), both involved in intracellular signaling and GPCR pathways, aligns with the hypothesis that microbial metabolites modulate both activation and resolution of immune responses. The activation of GPR109A by butyrate has been shown to promote anti-inflammatory responses in colonic macrophages and dendritic cells, increasing the expression of IL10 (Singh et al., 2014). Propionate has been shown to activate both GPR41 and GPR43 but not GPR109A (Brown et al., 2003). Recent studies have demonstrated that isobutyrate and isovalerate directly activate the receptor GPR109A (Abdul Rahim, 2016 unpublished data; Fang et al., 2025).

While metabolite effects on innate immunity were dominant, changes in adaptive markers were also observed. Surprisingly, propionate downregulated FOXP3, CXCL10 and IL10 in basal LPMCs and CXCL10 and IL10 under LPS stimulation, suggesting a temporary reduction in Treg activity to favor effector responses. This contrasts with prior findings where SCFAs increased FOXP3 and IL10 via HDAC inhibition (Arpaia et al., 2013) or through the binding of the receptor GPR43 present on innate immune cells in mice colonic *lamina propria* (Smith et al., 2013). Park et al. (2015) demonstrated that propionate might induce both effector and regulatory responses based on the immunological conditions. Specifically, in a situation of fight against pathogens, propionate might promote differentiation of T cells into helper phenotypes, which could explain the limitation of regulatory pathways under LPS stimulation observed in our study. Similarly, in inflammatory contexts, propionate increased IFN- $\gamma$  via HDAC inhibition in CD8<sup>+</sup> T cells (Luu et al., 2018), reinforcing the hypothesis that SCFAs can either promote or restrain inflammation depending on the cellular environment. Xie et al. (2025) demonstrated that the immunomodulatory functions of isobutyrate and isovalerate were dependent on the stimulatory agent in PBMCs. Conversely, the upregulation of TNFSF13 (APRIL) by isovalerate suggests support for B cell survival and IgA responses, which are essential for mucosal defense. Isovalerate has been shown to act on B cells *in vitro* by enhancing the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway (Luu et al., 2025), a central regulator of cellular metabolism (Säemann et al., 2009). Since propionate also activates this pathway (Park et al., 2015), this may explain the similarity in their effects.

We did not observe any specific effect of 1,2-propanediol in our *in vitro* model. This metabolite is, however, further converted into propionate *in vivo* and its concentration may therefore remain low. Indeed, some of the metabolites produced during *in vitro* fermentation are not final products in the gut environment, as they can be utilized by other microbial species. 1,2-propanediol, derived from the fermentation of fucosylated MOs, can be used, for instance, by *Eubacterium hallii* or *Limosilactobacillus reuteri* to produce propionate, which is known for its immunomodulatory properties (Schwab et al., 2017; Cheng et al., 2020a).

## Conclusion

The results of this study provide compelling evidence that metabolites derived from bacterial fermentation of MOs have more pronounced immunomodulatory effects than MOs. Particularly, isovalerate and propionate, may serve as potent modulators of gut immune function, amplifying LPS inflammatory effects. The balance between pro-inflammatory stimulation and regulatory feedback, together with selective PRR modulation, suggests a sophisticated control mechanism to maintain intestinal immune balance. Unlike most studies focusing on isolated specific immune cell types, our study used LPMC cultures, which preserve key features of gut immunity and cellular interactions but does not fully capture the complexity of the *in vivo* environment, including epithelial barrier signaling and microbiota-host crosstalk. Moreover, while the concentrations used were physiologically relevant, they may not fully reflect *in situ* conditions across different gut compartments. Future studies incorporating co-culture models, intestinal organoids, or *in vivo* systems are needed to validate these findings and elucidate the underlying mechanisms, particularly receptor-mediated pathways and barrier-related effects.

## Acknowledgments

The authors are grateful to the staff of the rabbit experimental unit PECTOUL for animal care. The authors thank GENTYANE Platform, UMR INRAE/UCA GDEC, Clermont-Ferrand and Norah Fabre (INRAE GenPhySE, Toulouse, France) for her contribution in the experiments.

## References

- Abdul Rahim, M. B. H. (2016). Gut microbial metabolome: regulation of host metabolism by SCFAs. Imperial College London. Available at: <https://core.ac.uk/download/pdf/77011125.pdf>
- Apostolidis, E., Kwon, Y., Shinde, R., Ghaedian, R., and Shetty, K. (2011). Inhibition of *Helicobacter pylori* by Fermented Milk and Soymilk Using Select Lactic Acid Bacteria and Link to Enrichment of Lactic Acid and Phenolic Content. *Food Biotechnology* 25, 58–76. doi: 10.1080/08905436.2011.547118
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeken, J., deRoos, P., et al. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 504, 451–455. doi: 10.1038/nature12726
- Atochina, O., and Harn, D. (2005). LNFPIII/LeX-Stimulated Macrophages Activate Natural Killer Cells via CD40-CD40L Interaction. *Clinical and Vaccine Immunology* 12, 1041–1049. doi: 10.1128/CDLI.12.9.1041-1049.2005
- Ayechu-Muruzabal, V., Overbeek, S. A., Kostadinova, A. I., Stahl, B., Garssen, J., van't Land, B., et al. (2020). Exposure of Intestinal Epithelial Cells to 2'-Fucosyllactose and CpG Enhances Galectin Release and Instructs Dendritic Cells to Drive Th1 and Regulatory-Type Immune Development. *Biomolecules* 10, 784. doi: 10.3390/biom10050784
- Bajic, D., Niemann, A., Hillmer, A.-K., Mejias-Luque, R., Bluemel, S., Docampo, M., et al. (2020). Gut Microbiota-Derived Propionate Regulates the Expression of Reg3 Mucosal Lectins and Ameliorates Experimental Colitis in Mice. *Journal of Crohn's and Colitis* 14, 1462–1472. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjaa065
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., and Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software* 67, 1–48. doi: 10.18637/jss.v067.i01

- Boll, E. J., Lopez, D. V., Terne, M., Helsing, S., Parschat, K., and Jensen, S. R. (2024). Human milk oligosaccharides differentially support gut barrier integrity and enhance Th1 and Th17 cell effector responses in vitro. *Frontiers in Immunology* 15, 1359499.
- Borewicz, K., Gu, F., Saccenti, E., Arts, I., Penders, J., Thijs, C., et al. (2019). Correlating Infant Fecal Microbiota Composition and Human Milk Oligosaccharide Consumption by Microbiota of 1-Month-Old Breastfed Infants. *Molecular Nutrition & Food Research* 63. doi: 10.1002/mnfr.201801214
- Bosheva, M., Tokodi, I., Krasnow, A., Pedersen, H. K., Lukjancenka, O., Eklund, A. C., et al. (2022). Infant Formula With a Specific Blend of Five Human Milk Oligosaccharides Drives the Gut Microbiota Development and Improves Gut Maturation Markers: A Randomized Controlled Trial. *Frontiers in Nutrition* 9, 920362. doi: 10.3389/fnut.2022.920362
- Brown, A. J., Goldsworthy, S. M., Barnes, A. A., Eilert, M. M., Tcheang, L., Daniels, D., et al. (2003). The Orphan G Protein-coupled Receptors GPR41 and GPR43 Are Activated by Propionate and Other Short Chain Carboxylic Acids\*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 11312–11319. doi: 10.1074/jbc.M211609200
- Chen, X. (2015). “Human Milk Oligosaccharides (HMOS),” in *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, (Elsevier), 113–190. doi: 10.1016/bs.accb.2015.08.002
- Cheng, C. C., Duar, R. M., Lin, X., Perez-Munoz, M. E., Tollenaar, S., Oh, J.-H., et al. (2020a). Ecological Importance of Cross-Feeding of the Intermediate Metabolite 1,2-Propanediol between Bacterial Gut Symbionts. *Applied and Environmental Microbiology* 86, e00190-20. doi: 10.1128/AEM.00190-20
- Cheng, L., Kiewiet, M. B. G., Groeneveld, A., Nauta, A., and de Vos, P. (2019). Human milk oligosaccharides and its acid hydrolysate LNT2 show immunomodulatory effects via TLRs in a dose and structure-dependent way. *Journal of Functional Foods* 59, 174–184. doi: 10.1016/j.jff.2019.05.023
- Cheng, L., Kong, C., Walvoort, M. T. C., Faas, M. M., and de Vos, P. (2020b). Human Milk Oligosaccharides Differently Modulate Goblet Cells Under Homeostatic, Proinflammatory Conditions and ER Stress. *Molecular Nutrition & Food Research* 64, 1900976. doi: 10.1002/mnfr.201900976
- Comstock, S. S., Wang, M., Hester, S. N., Li, M., and Donovan, S. M. (2014). Select human milk oligosaccharides directly modulate peripheral blood mononuclear cells isolated from 10-d-old pigs. *British Journal of Nutrition* 111, 819–828. doi: 10.1017/S0007114513003267
- Coppa, G. V., Zampini, L., Galeazzi, T., Facinelli, B., Ferrante, L., Capretti, R., et al. (2006). Human Milk Oligosaccharides Inhibit the Adhesion to Caco-2 Cells of Diarrheal Pathogens: Escherichia coli, Vibrio cholerae, and Salmonella ftyris. *Pediatric Research* 59, 377–382. doi: 10.1203/01.pdr.0000200805.45593.17
- Eiwegger, T., Stahl, B., Schmitt, J., Boehm, G., Gerstmayr, M., Pichler, J., et al. (2004). Human Milk-Derived Oligosaccharides and Plant-Derived Oligosaccharides Stimulate Cytokine Production of Cord Blood T-Cells In Vitro. *Pediatric Research* 56, 536–540. doi: 10.1203/01.PDR.0000139411.35619.B4
- Engfer, M. B., Stahl, B., Finke, B., Sawatzki, G., and Daniel, H. (2000). Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition* 71, 1589–1596. doi: 10.1093/ajcn/71.6.1589

- Fang, X., Liu, H., Liu, J., Du, Y., Chi, Z., Bian, Y., et al. (2025). Isobutyrate confers resistance to inflammatory bowel disease through host-microbiota interactions in pigs. *Research*, research.0673. doi: 10.34133/research.0673
- Fiocchi, C. (2008). What is “physiological” intestinal inflammation and how does it differ from “pathological” inflammation?: *Inflammatory Bowel Diseases* 14, S77–S78. doi: 10.1002/ibd.20618
- Goehring, K. C., Kennedy, A. D., Prieto, P. A., and Buck, R. H. (2014). Direct Evidence for the Presence of Human Milk Oligosaccharides in the Circulation of Breastfed Infants. *PLoS ONE* 9, e101692. doi: 10.1371/journal.pone.0101692
- He, Y., Liu, S., Leone, S., and Newburg, D. S. (2014). Human colostrum oligosaccharides modulate major immunologic pathways of immature human intestine. *Mucosal Immunology* 7, 1326–1339. doi: 10.1038/mi.2014.20
- James, K., Bottacini, F., Contreras, J. I. S., Vigoureux, M., Egan, M., Motherway, M. O., et al. (2019). Metabolism of the predominant human milk oligosaccharide fucosyllactose by an infant gut commensal. *Scientific Reports* 9, 15427. doi: 10.1038/s41598-019-51901-7
- Kuntz, S., Rudloff, S., and Kunz, C. (2008). Oligosaccharides from human milk influence growth-related characteristics of intestinally transformed and non-transformed intestinal cells. *British Journal of Nutrition* 99, 462–471. doi: 10.1017/S0007114507824068
- Kurakevich, E., Hennet, T., Hausmann, M., Rogler, G., and Borsig, L. (2013). Milk oligosaccharide sialyl( $\alpha$ 2,3)lactose activates intestinal CD11c+ cells through TLR4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 17444–17449. doi: 10.1073/pnas.1306322110
- Lin, M. Y., de Zoete, M. R., van Putten, J. P. M., and Strijbis, K. (2015). Redirection of Epithelial Immune Responses by Short-Chain Fatty Acids through Inhibition of Histone Deacetylases. *Frontiers in Immunology* 6. doi: 10.3389/fimmu.2015.00554
- Luu, M., Krause, F. F., Monning, H., Wempe, A., Leister, H., Mainieri, L., et al. (2025). Dissecting the metabolic signaling pathways by which microbial molecules drive the differentiation of regulatory B cells. *Mucosal Immunology* 18, 66–75. doi: 10.1016/j.mucimm.2024.09.003
- Luu, M., Weigand, K., Wedi, F., Breidenbend, C., Leister, H., Pautz, S., et al. (2018). Regulation of the effector function of CD8+ T cells by gut microbiota-derived metabolite butyrate. *Scientific Reports* 8, 14430. doi: 10.1038/s41598-018-32860-x
- Mijan, M. A., Lee, Y.-K., and Kwak, H.-S. (2011). Classification, Structure, and Bioactive Functions of Oligosaccharides in Milk. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 31, 631–640. doi: 10.5851/kosfa.2011.31.5.631
- Newberry, R. D., and Gustafsson, J. K. (2016). “Anatomy and Function of the Gut Immune System,” in *Encyclopedia of Immunobiology*, (Elsevier), 427–433. doi: 10.1016/B978-0-12-374279-7.07006-5
- Park, J., Kim, M., Kang, S. G., Jannasch, A. H., Cooper, B., Patterson, J., et al. (2015). Short-chain fatty acids induce both effector and regulatory T cells by suppression of histone deacetylases and regulation of the mTOR–S6K pathway. *Mucosal Immunology* 8, 80–93. doi: 10.1038/mi.2014.44
- Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., and Cao, K.-A. L. (2017). mixOmics: An R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. *PLoS Computational Biology* 13, e1005752. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005752

- Rosa, F., Sharma, A. K., Gurung, M., Casero, D., Matazel, K., Bode, L., et al. (2022). Human Milk Oligosaccharides Impact Cellular and Inflammatory Gene Expression and Immune Response. *Frontiers in Immunology* 13, 907529. doi: 10.3389/fimmu.2022.907529
- Säemann, M. D., Haidinger, M., Hecking, M., Hörl, W. H., and Weichhart, T. (2009). The Multifunctional Role of mTOR in Innate Immunity: Implications for Transplant Immunity. *American Journal of Transplantation* 9, 2655–2661. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02832.x
- Salli, K., Hirvonen, J., Siitonen, J., Ahonen, I., Anglenius, H., and Maukonen, J. (2021). Selective Utilization of the Human Milk Oligosaccharides 2'-Fucosyllactose, 3-Fucosyllactose, and Difucosyllactose by Various Probiotic and Pathogenic Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69, 170–182. doi: 10.1021/acs.jafc.0c06041
- Schwab, C., Ruscheweyh, H.-J., Bunesova, V., Pham, V. T., Beerenwinkel, N., and Lacroix, C. (2017). Trophic Interactions of Infant Bifidobacteria and *Eubacterium hallii* during L-Fucose and Fucosyllactose Degradation. *Frontiers in Microbiology* 8, 95. doi: 10.3389/fmicb.2017.00095
- Shams-Ud-Doha, K., Kitova, E. N., Kitov, P. I., St-Pierre, Y., and Klassen, J. S. (2017). Human Milk Oligosaccharide Specificities of Human Galectins. Comparison of Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Glycan Microarray Screening Results. *Analytical Chemistry* 89, 4914–4921. doi: 10.1021/acs.analchem.6b05169
- Shi, C., and Pamer, E. G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology* 11, 762–774. doi: 10.1038/nri3070
- Singh, N., Gurav, A., Sivaprakasam, S., Brady, E., Padia, R., Shi, H., et al. (2014). Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity* 40, 128–139. doi: 10.1016/j.immuni.2013.12.007
- Smith, E. A., and Macfarlane, G. T. (1997). Dissimilatory Amino Acid Metabolism in Human Colonic Bacteria. *Anaerobe* 3, 327–337. doi: 10.1006/anae.1997.0121
- Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-Y, M., et al. (2013). The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis. *Science* 341, 569–573. doi: 10.1126/science.1241165
- Šuligoj, T., Vignæs, L. K., Abbeele, P. V. den, Apostolou, A., Karalis, K., Savva, G. M., et al. (2020). Effects of Human Milk Oligosaccharides on the Adult Gut Microbiota and Barrier Function. *Nutrients* 12, 2808. doi: 10.3390/nu12092808
- Thomas, P. G., Carter, M. R., Atochina, O., Da'Dara, A. A., Piskorska, D., McGuire, E., et al. (2003). Maturation of Dendritic Cell 2 Phenotype by a Helminth Glycan Uses a Toll-Like Receptor 4-Dependent Mechanism. *The Journal of Immunology* 171, 5837–5841. doi: 10.4049/jimmunol.171.11.5837
- Wagner, C., Torow, N., Hornef, M. W., and Lelouard, H. (2022). Spatial and temporal key steps in early-life intestinal immune system development and education. *The FEBS Journal* 289, 4731–4757. doi: 10.1111/febs.16047
- Ward, R. E., Niñonuevo, M., Mills, D. A., Lebrilla, C. B., and German, J. B. (2006). In Vitro Fermentation of Breast Milk Oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 4497–4499. doi: 10.1128/AEM.02515-05
- Weigmann, B., Tubbe, I., Seidel, D., Nicolaev, A., Becker, C., and Neurath, M. F. (2007). Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. *Nature Protocols* 2, 2307–2311. doi: 10.1038/nprot.2007.315

Wu, R. Y., Li, B., Koike, Y., Määttä, P., Miyake, H., Cadete, M., et al. (2019). Human Milk Oligosaccharides Increase Mucin Expression in Experimental Necrotizing Enterocolitis. *Molecular Nutrition Food Res* 63, 1800658. doi: 10.1002/mnfr.201800658

Xiao, L., Leusink-Muis, T., Kettelarij, N., van Ark, I., Blijenberg, B., Heslen, N. A., et al. (2018). Human Milk Oligosaccharide 2'-Fucosyllactose Improves Innate and Adaptive Immunity in an Influenza-Specific Murine Vaccination Model. *Frontiers in Immunology* 9, 452. doi: 10.3389/fimmu.2018.00452

Xiao, L., van De Worp, W. R., Stassen, R., van Maastrigt, C., Kettelarij, N., Stahl, B., et al. (2019). Human milk oligosaccharides promote immune tolerance via direct interactions with human dendritic cells. *European Journal of Immunology* 49, 1001–1014. doi: 10.1002/eji.201847971

Xie, Z., Eriksen, D. B., Johnsen, P. R., Nielsen, D. S., and Frøkiær, H. (2025). The effect of microbial metabolites from colonic protein fermentation on bacteria-induced cytokine production in dendritic cells. *BioFactors* 51, e70007. doi: 10.1002/biof.70007

Xu, G., Davis, J. C., Goonatilleke, E., Smilowitz, J. T., German, J. B., and Lebrilla, C. B. (2017). Absolute Quantitation of Human Milk Oligosaccharides Reveals Phenotypic Variations during Lactation. *The Journal of Nutrition* 147, 117–124. doi: 10.3945/jn.116.238279

Yu, Z.-T., Chen, C., and Newburg, D. S. (2013). Utilization of major fucosylated and sialylated human milk oligosaccharides by isolated human gut microbes. *Glycobiology* 23, 1281–1292. doi: 10.1093/glycob/cwt065

Zhang, W., Yan, J., Wu, L., Yu, Y., Ye, R. D., Zhang, Y., et al. (2019). In vitro immunomodulatory effects of human milk oligosaccharides on murine macrophage RAW264.7 cells. *Carbohydrate polymers* 207, 230–238. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.11.039

### Supplementary data

Table S1: Endotoxin and purity levels of the tested MOs. Data provided by the manufacturer Inbiose. EU: unit of endotoxin activity.

	Endotoxin	Purity (%)
LNT	< 0.05 EU/mg	93.70
2'-FL	< 0.05 EU/mg	98.40
6'-SL	< 0.05 EU/mg	97.30

Table S2: Characteristics of the individual sampled for the experiments

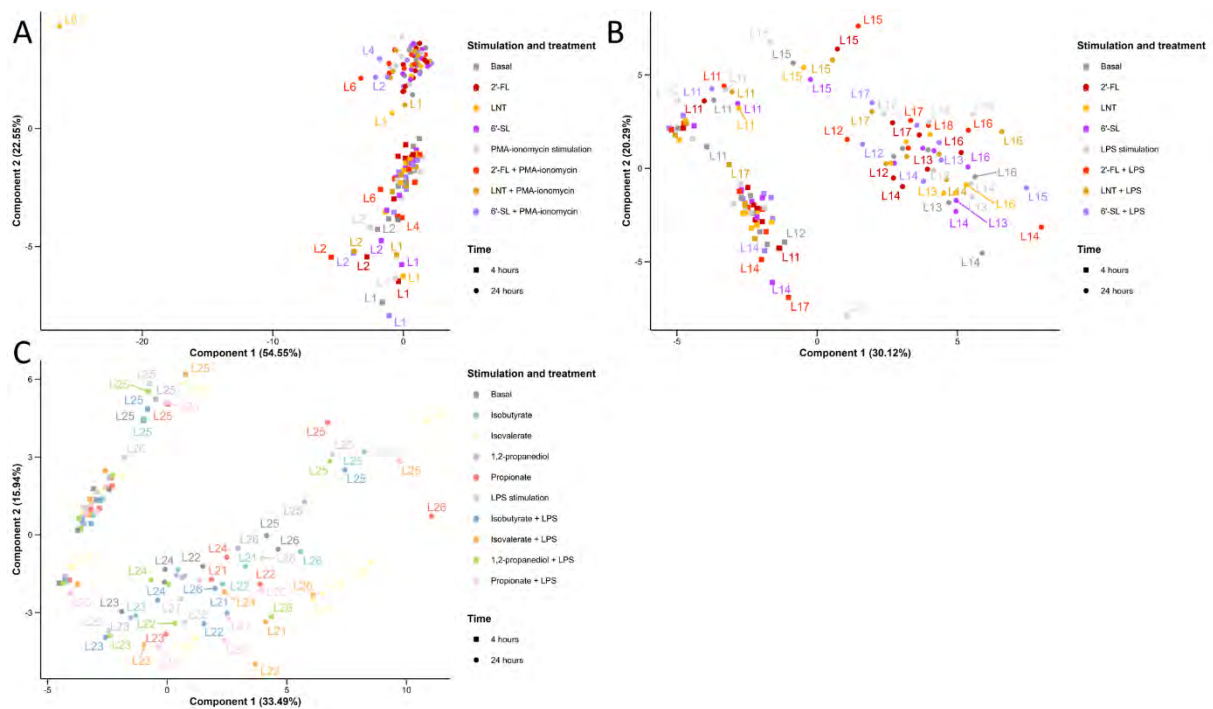
Experiment	Individual	Age (d)	Body weight (g)	Caecum weight (g)	Stimulation	Treatment
1	Rabbit 1	21	NA	3	PMA-ionomycin	MOs
1	Rabbit 2	21	NA	3.28	PMA-ionomycin	MOs
1	Rabbit 3	21	NA	3.13	PMA-ionomycin	MOs
1	Rabbit 4	21	NA	5.2	PMA-ionomycin	MOs
1	Rabbit 5	22	NA	4.1	PMA-ionomycin	MOs
1	Rabbit 6	22	NA	3.1	PMA-ionomycin	MOs
1	Rabbit 7	24	379	3.82	PMA-ionomycin	MOs
1	Rabbit 8	24	394	3.53	PMA-ionomycin	MOs
1	Rabbit 9	25	450	4.43	PMA-ionomycin	MOs
1	Rabbit 10	25	432	3.69	PMA-ionomycin	MOs
2	Rabbit 11	20	305	2.32	LPS	MOs
2	Rabbit 12	20	284	2.47	LPS	MOs
2	Rabbit 13	23	279	2.5	LPS	MOs
2	Rabbit 14	23	289	2.65	LPS	MOs

2	Rabbit 15	25	400	3.26	LPS	MOs
2	Rabbit 16	25	363	3.11	LPS	MOs
2	Rabbit 17	23	478	3.27	LPS	MOs
2	Rabbit 18	23	497	3.28	LPS	MOs
3	Rabbit 19	25	582	4.41	LPS	Metabolites
3	Rabbit 20	25	600	3.58	LPS	Metabolites
3	Rabbit 21	23	316	3.47	LPS	Metabolites
3	Rabbit 22	23	353	3.5	LPS	Metabolites
3	Rabbit 23	25	422	4.21	LPS	Metabolites
3	Rabbit 24	25	412	3.86	LPS	Metabolites

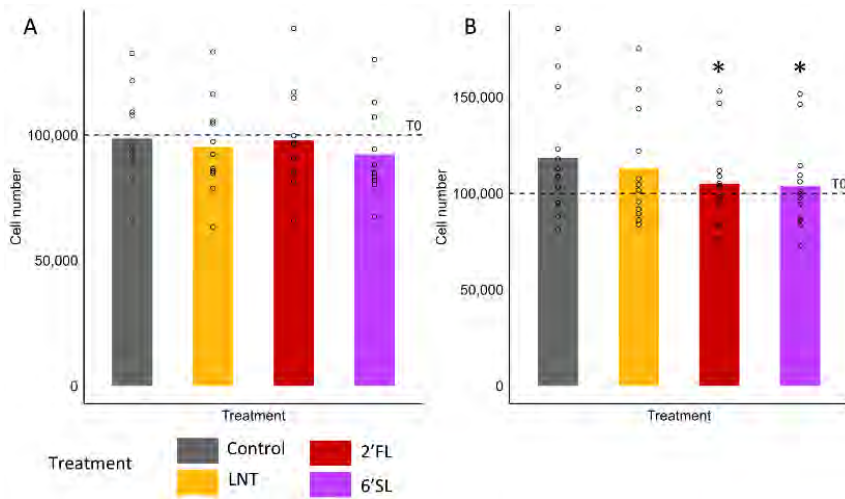
Table S3: List of oligonucleotides used for gene expression analysis with the biomark microfluidic system using 96.96 Dynamic arrays IFC for gene expression (Fluidigm)

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
B2M	AACGTGGAACAGTCAGACC	AGTAATCTCGATCCCATTTC
CCL2	TTCACCAACAAGACCATCTCA	TGGGTTGTGGAATAAGAGGTCA
CCL20	GTGTGCAGATCCGAAGAAGG	GCTAGACCTTCAATGATGTGCA
CCR5	CAGTGTACACCCGATCCACC	CGTCTGGGCCCTCTATGAC
CD14	TAGACCTCAGCCACAACCTCG	AGGTTCCAGACATCCCCATC
CD69	AGCAAGTCACGAAGGGTCTC	GAGAACTCACTGGCTCGG
CD80	TCAAATACGGGGAGCTGTCTG	AGGCCAGGCAGTAGAGAACT
CD86	ACGCAACCATTTACTGTGTCC	CCAGAGCCTTGGTTTTTCCAC
CST3	GAGAGCGAGTACAACAAGGG	CACGTGGTCCGGCCTATC
CXCL10	TCATTCTGCAAGTCAATCTTG	AGACATCTCTTCTCCCCATCC
CXCL8	TGGCTCTCTTGGCAACCTTC	CAGAACTGCAGCTTCAAAAGAGT
FLT3	GTGGGTGCTTTGTGATTTCGC	AGCTTGGTGCATTTCTTGCC
FOXP3	AGGTCTTTGAGGAGCCAGAG	TGTACCACCTCTCTCTGGAGG
GAPDH	AGGTCGGAGTGAACGGATT	ATGGCGACAACATCCACTTT
HCAR2	TCAAGATCAAGAGGGCCATCA	AAGAAGTTGGGGAACGAGGG
IL10	AGAACCACAGTCCAGCCATC	TTTTCACAGGGGAGAAATCG
IL10RA	GAGGTGGGGACGTTCTGCTT	ATGCTGAGGTTGGTCGCAGT
IL13	TGCCTTGGCAGCCTCGTATC	GTGCCATTGCAGAGTGGAGC
IL15	AGGCTGGCATTCTGTCTTC	TGCCAGTTGGCTTCTGTTTTAG
IL17A	AAGGCCTTCAGACTACTACAATCGA	CGGTGGAGAGTCCAAGGTGA
IL18	TGTAAGCCTCTCTGTGAAGTGT	TCTTATCTTCTGTCTGCGAGA
IL1B	CAACAAGTGGTGTCTCCAT	GAGGTGCTGATGTACCAGT
IL1RN	GTCATGGGGAGGTTAAGGG	ATTTACAATGCCGGAGCAC
IL2	TCCAGGATGCTCACATTCAA	GCACTTCTCCAGAGGTTTG
IL27	AAGCTGCTGTCTGAGGTTCTG	TCAAGGACACGTTGGGGAAC
IL2RA	ACGGGTCATCTACATGCTT	AGGCTCCATTTGACTTTGCA
IL4	GAAGCTGAGCAACTGTCTG	TCTTGCATGGCGGTCTTTAG
IL6	CTACCGCTTTCCCACTTCAG	TCCTCAGCTCCTTGATGGTCTC
ITGA1	ACGTCTCTGATGAATTGGCCC	GCACTGAAGCCAGTTTGAGAC
ITGAM	CTTCTCCAAAGACTCCCTGAC	TCCAGGTAAGCATCGGACTC
ITGAX	GATGGCGAAGACTCCTACGG	TGTCACATGTCAGACGCAGG
JCHAIN	AGTGTGTCCGCATCACTTCC	CGGTTCTCAATGGTGAGGTG
LGALS1	GAAGGCGTTTCCCTTCCAGC	TCTCTAGGTTGAGGCGGTTG
LGALS3	AGGGAAGAAAGGCAGACGAC	CAAGTGGGCATCATTGACCG
LGALS9	GAGGACGGGCTTACATCAC	GAAGGCAATGTCGTTCTCGC
MKI67	TGGAGTAATCTATGTGGGCCA	CACCAAGAGCCTTTACCAAAA
MYD88	GGATGGTGGTGGTCTGCTC	TTCTTCATGGCCTTGTACTTGA
NOS2	GAACTCTCAGCTCATCCGGT	CACCTCGAGCACAATGTCAG
PGK1	CTAGGCGGAGCTAAAGTTGC	AGCCATTCCACCACCAATAA
PLA2G4A	CGTCAAGCCCGACGTCTCTG	GCACTTCCCCAGACCCCAT
PTGS2	TACGGTGAAGAACTGCTCCAC	GAGGTTAGAGAAGGCTTCCCA
PTPRC	TGTCATGGGAAAGTGCAGC	TGGGAGATGATCACATGCTGG

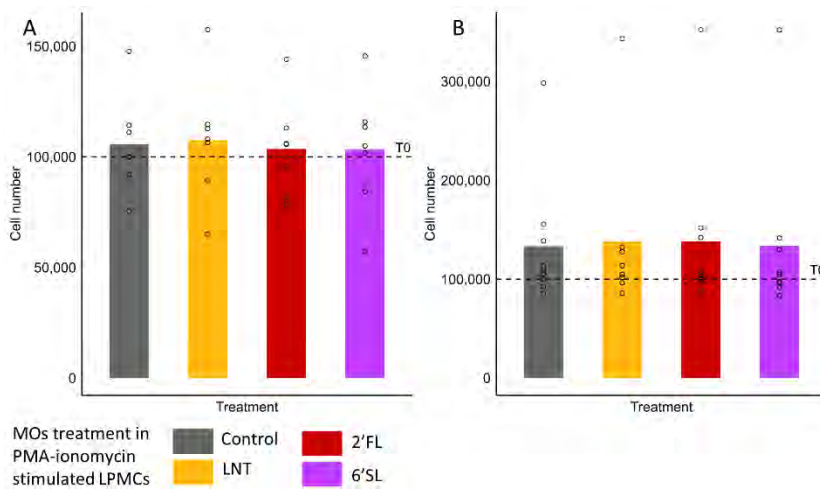
S100A8	AGGAAATTACCAGCCCTCT	CGGACACGCCTATCTTCACA
S100A9	GAGGACCTGGACACGAACC	GGAGGCTTTATTTTCCCACC
SPRY1	AGGTCCGAAAGGGTGATTCTG	ACTTGTGCCGTGTTAGGTCC
ST3GAL1	CCCCCARGATCARAGTGAR	TGGAGAAGATGACCGACAGA
ST3GAL2	GGACGGGCACAACCTTCATC	GGCACTCTCAGGGTACATGA
ST3GAL4	CTCTGGTCTGGTCCTCATG	AGGCATGGTTCCTTCTTCTCT
TGFB1	CAGTGGAAGACCCACATCTC	GACGCAGGCAGCAATTATCC
TLR2	GATGGATTTTGCCGGAGTCC	TCGTAGCTCTGCAGGTTTGA
TLR3	AGGTGTCCTTGGACTTGAAGC	GTTTCGATAGCTTGCTGAACTGC
TLR4	CATGTCTCAGAAGTGCACCTTTC	CCACAGCCACTAGTTTCTGC
TLR5	ACCTCGCCACAACAAGATA	GGGATCTGAATGTTTGGGCC
TNF	GGAGGAAGAGTCCCCAAACAA	ATCTGGGCCACAGGGTTGA
TNFSF13	CACCTTTCACCTTGTCCCA	CCGGGAATTACGACACTCA
TNFSF13B	AGGAAGAAGCGTGCCGTT	AGTACCCGGTTTCTTTGACC
TOP1	GCAGGCAATGAGAAGGAAGA	CACGTACTCCTGACCATCCA



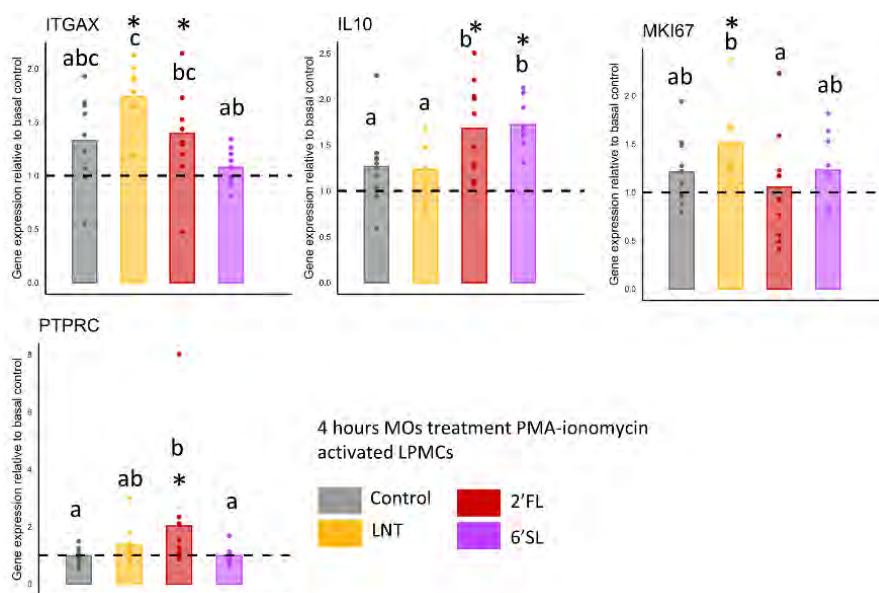
Supplementary Figure 1: Principal component analysis (PCA) plot of LPMC derived from suckling rabbit cecum treated with (A) milk oligosaccharides and PMA-ionomycin, (B) milk oligosaccharides and LPS, (C) metabolites and LPS. Each dot represents a single replicate of one individual ( $n = 6, 8$  or  $10$  rabbits). PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate; LPS: lipopolysaccharide; LNT: lacto-N-tetraose; 2'-FL: 2'-fucosyllactose; 6'-SL: 6'-sialyllactose.



Supplementary Figure 2: Cell viability assay of rabbit cecal LPMCs treated with or without MOs in basal conditions for (A) 4 or (B) 24 h of culture ( $n = 15$  rabbits). \* significantly different from basal control ( $p < 0.05$ ), LNT: lacto-N-tetraose; 2'-FL: 2'-fucosyllactose; 6'-SL: 6'-sialyllactose.

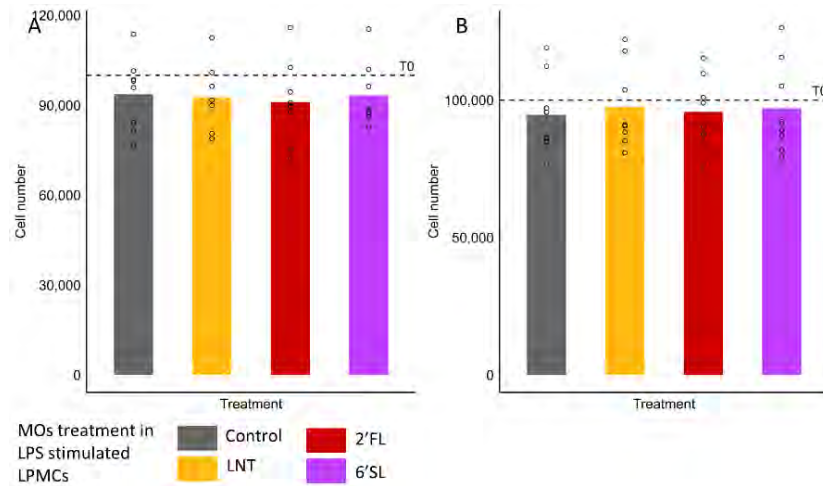


Supplementary Figure 3: Cell viability assay of rabbit cecal LPMCs treated with or without MOs in PMA-ionomycin stimulated conditions for (A) 4 or (B) 24 h of culture ( $n = 7$  rabbits). LNT: lacto-N-tetraose; 2'-FL: 2'-fucosyllactose; 6'-SL: 6'-sialyllactose. PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate.

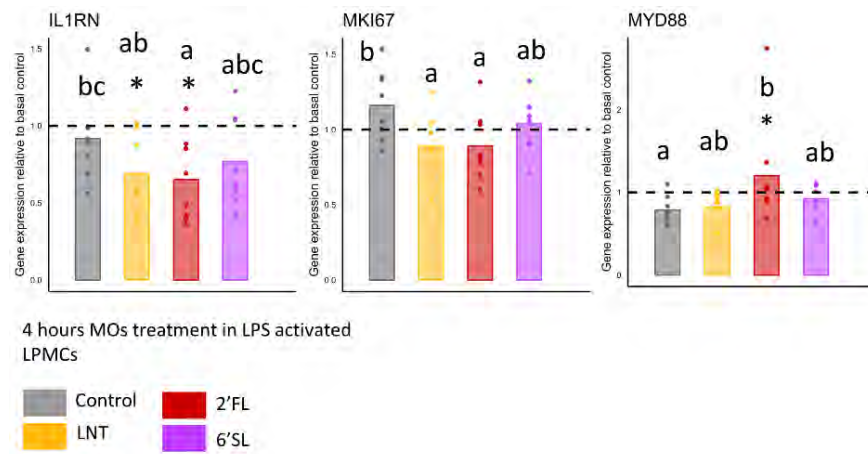


Supplementary Figure 4: Relative expression of genes in PMA-ionomycin stimulated LPMCs derived from suckling rabbit cecum treated with or without MOs in stimulated conditions for 4 h. Figures represent the expression levels relative to the control ( $n = 10$  rabbits). The dashed line indicates the relative expression of genes in the basal control. \* significantly different from

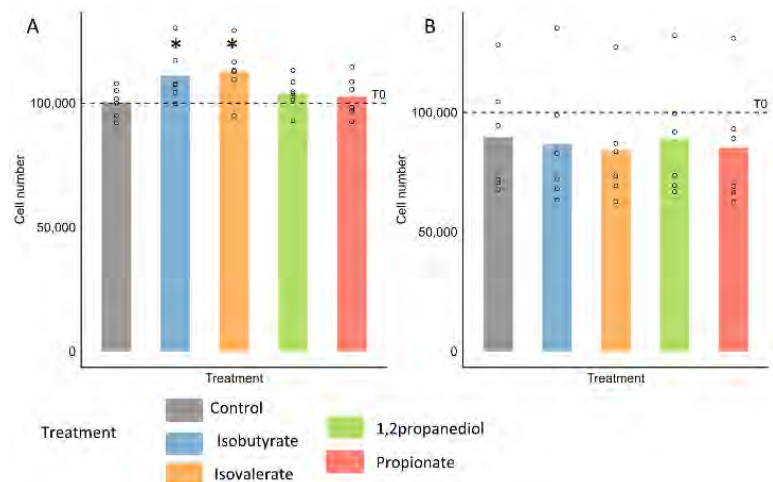
control in basal conditions with  $p < 0.05$ . Mean values with a different superscript differ ( $p < 0.05$ ). LNT: lacto-N-tetraose; 2'-FL: 2'-fucosyllactose; 6'-SL: 6'-sialyllactose. PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate.



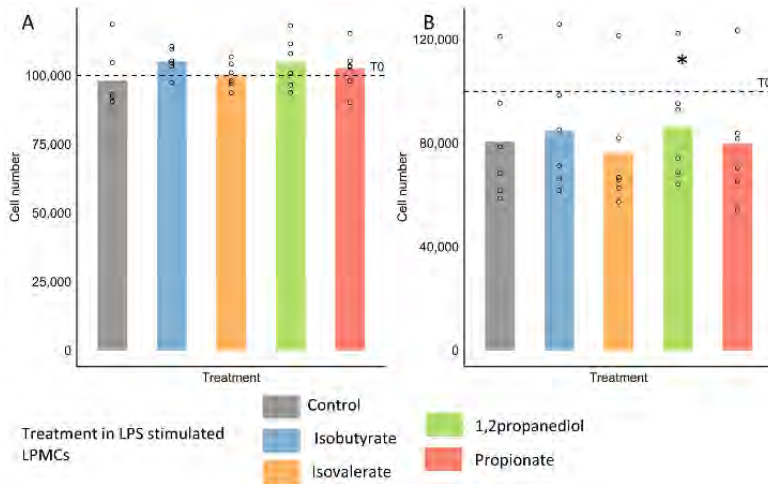
Supplementary Figure 5: Cell viability assay of rabbit cecal LPMCs treated with or without MOs in LPS stimulated conditions for (A) 4 or (B) 24 h of culture ( $n = 7$  rabbits). LNT: lacto-N-tetraose; 2'-FL: 2'-fucosyllactose; 6'-SL: 6'-sialyllactose. LPS: lipopolysaccharide.



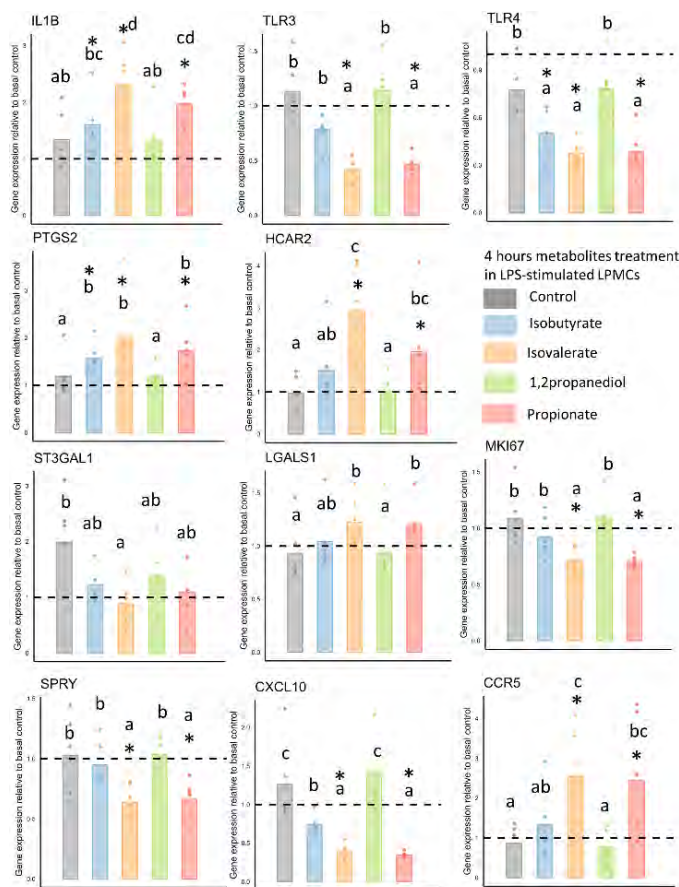
Supplementary Figure 6: Relative expression of genes in LPS stimulated LPMCs derived from suckling rabbit cecum treated with or without MOs in stimulated conditions for 4 h. Figures represent the expression levels relative to the control ( $n = 8$  rabbits). The dashed line indicates the relative expression of genes in the basal control. \* significantly different from control in basal conditions with  $p < 0.05$ . Mean values with a different superscript differ ( $p < 0.05$ ). LNT: lacto-N-tetraose; 2'-FL: 2'-fucosyllactose; 6'-SL: 6'-sialyllactose. LPS: lipopolysaccharide.



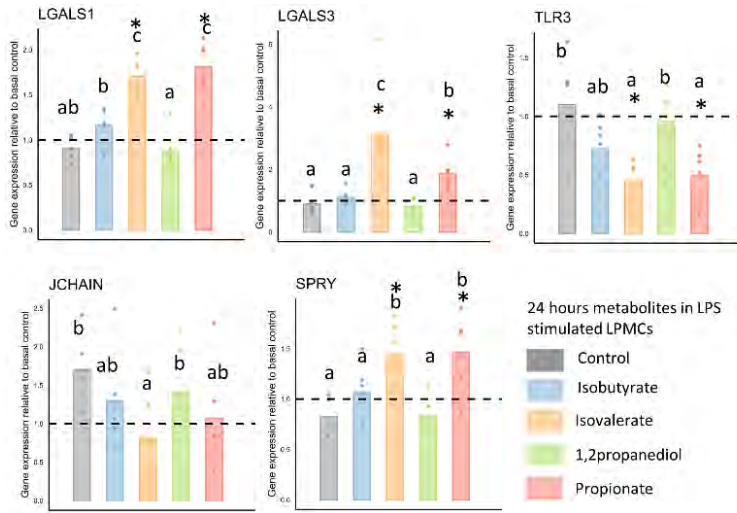
Supplementary Figure 7: Cell viability assay of rabbit cecal LPMCs treated with or without metabolites in basal conditions for (A) 4 or (B) 24 h of culture ( $n = 6$  rabbits). \* significantly different from basal control ( $p < 0.05$ ).



Supplementary Figure 8: Cell viability assay of rabbit cecal LPMCs treated with or without metabolites in LPS stimulated conditions for (A) 4 or (B) 24 h of culture (n = 6 rabbits). \* significantly different from stimulated control (p < 0.05), LNT: lacto-N-tetraose; 2'-FL: 2'-fucosyllactose; 6'-SL: 6'-sialyllactose. LPS: lipopolysaccharide.



Supplementary Figure 9: Relative expression of genes in LPS stimulated LPMCs derived from suckling rabbit cecum treated with or without metabolites in stimulated conditions for 4 h. Figures represent the expression levels relative to the control (n = 6 rabbits). The dashed line indicates the relative expression of genes in the basal control. \* significantly different from control in basal conditions with p < 0.05. Mean values with a different superscript differ (p < 0.05). LPS: lipopolysaccharide.



Supplementary Figure 10: Relative expression of genes in LPS stimulated LPMCs derived from suckling rabbit cecum treated with or without metabolites in stimulated conditions for 24 h. Figures represent the expression levels relative to the control ( $n = 6$  rabbits). The dashed line indicates the relative expression of genes in the basal control. \* significantly different from control in basal conditions with  $p < 0.05$ . Mean values with a different superscript differ ( $p < 0.05$ ). LPS: lipopolysaccharide.



## Discussion générale et perspectives



Le sevrage est une période critique en élevage porcin et cunicole, qui peut conduire à une dysfonction de la barrière intestinale, à l'origine de diarrhées. Les antibiotiques sont aujourd'hui une méthode de lutte contre ces diarrhées. La recherche d'alternatives permettant de prévenir les diarrhées est à ce jour une priorité pour limiter l'utilisation des antibiotiques et l'antibiorésistance. Les oligosaccharides du lait sont une piste prometteuse, en raison de leurs nombreux bénéfices, notamment sur le microbiote et le système immunitaire. Toutefois, leurs effets, ainsi que l'impact de la diversité structurale, ont été peu étudiés chez le porc et le lapin.

Dans ce travail de thèse, nous avons émis l'hypothèse que les oligosaccharides du lait modèleraient le microbiote et le système immunitaire des porcelets et des lapereaux, mais que ces effets varieraient selon leur structure. Les travaux présentés dans cette thèse visaient à **comprendre les liens fonctionnels entre la diversité de structure des MOs, les capacités métaboliques des bactéries commensales du microbiote et la réponse immunitaire intestinale**. L'enjeu final étant de favoriser la fonctionnalité de la barrière intestinale au sevrage et de limiter l'incidence des troubles digestifs ainsi que l'usage des antibiotiques en élevage.

Dans un premier temps, les choix expérimentaux concernant la culture de bactéries isolées et l'utilisation de cultures primaires de cellules immunitaires de la *lamina propria*, mais également le choix des quatre oligosaccharides du lait utilisés dans nos études, seront discutés. Ensuite, la nécessité de disposer d'outils sous la forme d'une base de données regroupant de manière automatique les données de la littérature pour analyser la diversité des MOs en lien avec ses sources de variabilité feront l'objet d'une réflexion. Les effets des MOs sur des bactéries intestinales commensales du porc et du lapin seront ensuite interprétés en fonction du type de structure de MO. De plus, l'analyse des effets directs et indirects des MOs sur les cellules immunitaires de nos espèces d'intérêts sera décrite. Enfin, les effets des MOs sur la mise en place de l'holobionte dans nos espèces d'intérêts seront discutés. Des perspectives d'amélioration de nos modèles expérimentaux seront alors proposées ainsi que les potentiels d'utilisation des MOs en élevage.

## I. Justification de nos stratégies expérimentales et méthodologiques

### A. Stratégie expérimentale générale

Afin de répondre aux objectifs de cette thèse, nous avons élaboré une stratégie expérimentale en deux temps, combinant des approches complémentaires, *in silico* et *in vitro*.

Dans un premier temps, une stratégie *in silico* a été développée pour mieux appréhender la diversité des oligosaccharides du lait. L'objectif était de poser les bases d'une caractérisation des structures rapportées dans la littérature scientifique. Pour ce faire, un thésaurus de synonymes a été construit afin d'unifier les multiples dénominations rencontrées. Compte tenu de l'importante hétérogénéité de composition des MOs entre espèces de mammifères, nous avons également effectué une annotation manuelle d'un corpus de textes scientifiques, dans la perspective d'un futur travail d'analyse automatisée de textes et données issus de la littérature scientifique. Cette étape, qui s'inscrit dans un projet ANR (HoloOLIGO) plus large,

visait à structurer les connaissances existantes sur les spécificités des MOs au travers des espèces et sur les sources de variation.

Dans un second temps, la fonctionnalité des MOs a été évaluée *in vitro* à travers deux séries d'expérimentations complémentaires. Une première étude s'est intéressée à la dégradation des MOs par des bactéries intestinales commensales isolées de porcelets et de lapereaux, en fonction de la structure des MOs. Les métabolites issus de cette métabolisation ont ensuite été sélectionnés pour une seconde étude, dédiée à l'analyse de la réponse immunitaire intestinale. Celle-ci a été explorée selon deux modalités : (i) l'effet direct des MOs sur les cellules immunitaires intestinales, et (ii) leur effet indirect via les métabolites produits par les bactéries. L'ensemble de ces travaux forme un dispositif expérimental incrémental, chaque étape étant construite en fonction des résultats des précédentes : le choix des MOs testés *in vitro* découle d'une analyse bibliographique pour le porc et de données préliminaires au laboratoire pour le lapin, et les métabolites sélectionnés pour les tests immunitaires proviennent des métabolisations bactériennes.

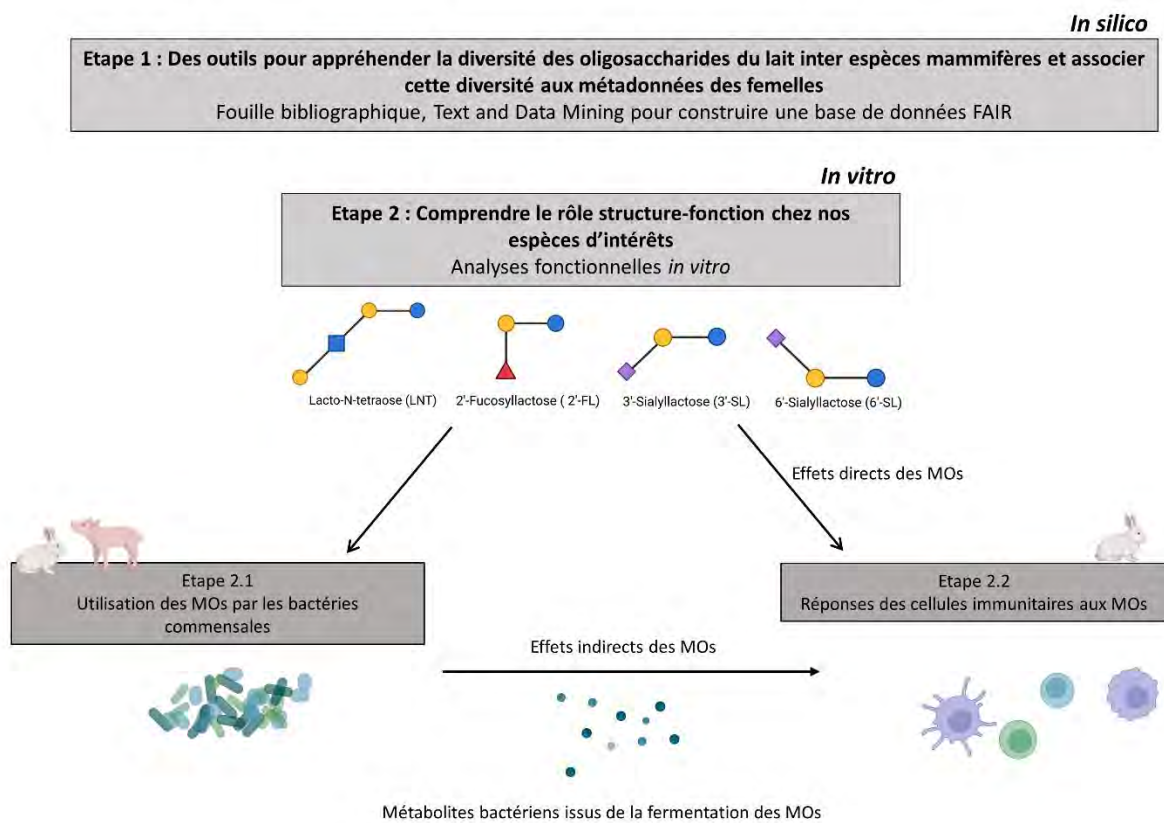


Figure 28 : Stratégie expérimentale pour répondre à l'objectif de thèse. MOs : oligosaccharides du lait.

Toutefois, le choix des MOs testés a été fortement contraint par leur disponibilité commerciale, actuellement limitée. En effet, seuls quelques MOs, généralement de petite taille et à structure relativement simple, sont commercialisés, tels que le 2'-FL, le 6'-SL, le LNT ou encore le LNnT (Urashima et al., 2025). Nous avons choisi d'étudier les mêmes oligosaccharides du lait, intra-espèce, pour l'ensemble des études fonctionnelles sur le microbiote et la réponse immunitaire, afin d'obtenir une vue d'ensemble cohérente de leurs effets sur ces différentes composantes de la barrière intestinale.

Lors de la sélection des MOs, des données de la littérature sur la composition en MOs du lait porcin étaient disponibles (Albrecht et al., 2014; Mudd et al., 2016; Salcedo et al., 2016), contrairement au lait de lapine, pour lequel seules les données préliminaires issues du projet HoloOLIGO étaient accessibles. Afin de représenter les principales classes de MOs (neutres, neutres fucosylés et sialylés) pour répondre à l'hypothèse de l'impact structurel, nous avons retenu des structures courantes et disponibles, en tenant compte des spécificités propres à chaque espèce, notamment pour les MOs sialylés, majoritaires chez ces deux espèces. Ainsi, le LNT, pour les MOs neutres, et le 2'-FL, pour les MOs neutres fucosylés, ont été étudiés chez le porc et le lapin, tandis que pour les MOs sialylés, le 6'-SL a été choisi pour le lapin, chez qui il est majoritaire, et le 3'-SL a été retenu pour le porc, conformément aux données disponibles chez cette espèce (Mudd et al., 2016). Enfin, nous avons utilisé une concentration unique et standardisée pour tous les MOs testés, indépendamment de leur concentration dans le lait. Ce choix vise à comparer leurs effets sur une base équivalente, en neutralisant le facteur dose. L'objectif n'était pas de reproduire fidèlement les concentrations physiologiques des MOs dans le lait, mais bien de caractériser les effets propres à chaque structure dans un cadre expérimental contrôlé.

## B. Evaluation des effets des MOs sur le microbiote

L'objectif de cette première expérimentation *in vitro*, était d'évaluer la capacité de bactéries intestinales commensales issues de fèces de porcelets et de contenu caecal de lapereaux à dégrader 3 MOs de structures différentes. Pour cela nous avons choisi d'utiliser une approche culture-dépendante, fondée sur l'isolement et l'étude fonctionnelle de souches bactériennes spécifiques.

### 1. Intérêt de l'approche culture-dépendante pour les études fonctionnelles

L'approche culture-dépendante permet de tester directement des hypothèses fonctionnelles en conditions contrôlées, indispensables pour valider des prédictions *in silico*. Elle permet également d'isoler les contributions spécifiques de certaines bactéries et d'approfondir leur physiologie, notamment via le séquençage de leur génome, des tests de croissance et des caractérisations métaboliques (Stewart, 2012; Lagier et al., 2015; Clavel et al., 2017). Toutefois, l'approche culture-dépendante ne permet pas de prendre en compte les interactions microorganismes-hôte comme les modèles *in vivo* (Bajury et al., 2018).

Nous avons fait le choix de ne pas recourir à des souches de collection, mais d'isoler directement des bactéries intestinales issues de nos espèces modèles (porc et lapin). Cette décision vise à garantir la représentativité écologique et fonctionnelle des souches testées. L'isolement n'avait pas de visée exhaustive ou quantitative, mais devait permettre d'obtenir un échantillon qualitatif représentatif incluant les différentes familles majoritaires du microbiote intestinal des jeunes animaux. Les bactéries intestinales, bien que provenant du même environnement, ont des besoins spécifiques (Tramontano et al., 2018). La mise en place de conditions de culture adaptées à chaque souche a donc été essentielle. L'isolement bactérien a été réalisé par culture anaérobie sur différents milieux agar, suivie d'une sélection de colonies basée sur la diversité morphologique. En moyenne, une dizaine de colonies par boîte ont été sélectionnées pour identification par affiliation taxonomique utilisant le

séquençage de l'ADNr 16S. Cette méthode, bien que limitée en nombre d'isolats analysés, permet une première exploration ciblée de la diversité bactérienne cultivable. Il est reconnu que les méthodes culture-dépendantes ne capturent qu'une partie du microbiote, en raison de la diversité des exigences de croissance, notamment chez les bactéries anaérobies strictes (Tally et al., 1975). Ainsi, la sensibilité à l'oxygène, les besoins nutritionnels spécifiques ou les interactions obligatoires entre espèces, peuvent limiter l'isolement de certaines bactéries (Lagkouvardos et al., 2017).

## 2. Conditions de culture bactérienne en présence des MOs

L'évaluation des effets des MOs sur les bactéries intestinales s'est appuyée sur un modèle de monoculture anaérobie. Notre stratégie d'analyse se décompose en trois volets complémentaires, la croissance, la métabolisation et l'analyse du génome. Les données obtenues nous ont permis de répondre à des questions fonctionnelles (i) les MOs sont-ils utilisés comme substrats de croissance ? (ii) Sont-ils métabolisés et quels sont les produits de cette métabolisation ? (iii) Quels sont les gènes potentiellement impliqués ?

La culture de bactéries intestinales strictement anaérobies représente un défi technique important, en raison de leur grande sensibilité à l'oxygène, qui peut affecter à la fois leur viabilité, leur métabolisme et leur croissance (Tally et al., 1975). La manipulation sous atmosphère contrôlée, en chambre anaérobie flexible, permet de maintenir une atmosphère strictement anaérobie (Speers et al., 2009). Toutefois, les conditions d'anaérobiose (conditions d'humidité, de température et présence de gaz) peuvent varier légèrement, influençant la reproductibilité des expérimentations (Mooiman et al., 2021).

Nous avons comparé la croissance des souches en présence de MOs avec celle obtenue avec du glucose, utilisé comme contrôle positif, sucre simple dont l'utilisation est bien caractérisée chez les bactéries intestinales (Galinier, 2018). Avant d'incuber les souches avec les MOs, nous avons validé l'absence de croissance dans un milieu dépourvu de carbone, afin de confirmer que les bactéries ne poussent pas avec les seuls composants du milieu. La mesure de croissance a été réalisée via la mesure de densité optique ( $DO_{600nm}$ ), couramment utilisée comme proxy de la densité cellulaire (Koch, 1970). Bien que cette méthode puisse introduire une légère variabilité des mesures (modification des volumes) (Deutzmann et al., 2022), elle offre un compromis entre précision, faisabilité en anaérobiose et échantillonnages multiples. En parallèle des mesures de croissance, nous avons analysé les produits de métabolisation présents dans les surnageants (AGCC et métabolites) par chromatographie en phase gazeuse et résonance magnétique nucléaire, afin d'évaluer si les MOs étaient non seulement utilisés, mais également métabolisés. Enfin, les souches sélectionnées ont fait l'objet d'un séquençage génomique afin d'identifier les gènes potentiellement impliqués dans la dégradation et l'utilisation des MOs. En particulier, les glycosides hydrolases (GHs) ont été recherchées, car elles sont responsables de l'hydrolyse des liaisons impliquées dans la structure des MOs. Cette stratégie d'analyse en trois volets (croissance, métabolisation, génome) offre une vue intégrée de la façon dont les bactéries intestinales interagissent avec les MOs. Enfin, la mise au point de milieux adaptés à nos isolats (YCFA modifié ou MRS modifié) constitue une base précieuse pour de futures expérimentations, visant à caractériser les fonctions métaboliques de ces bactéries.

## C. Evaluation des effets des MOs sur la réponse immunitaire intestinale

### 1. L'utilisation de LPMCs

Dans la littérature, l'étude des effets des MOs sur l'immunité repose majoritairement sur l'utilisation de cultures cellulaires *in vitro*. Deux approches principales sont utilisées, les lignées cellulaires, faciles à cultiver et standardisées, et les cultures primaires, issues directement d'animaux ou d'humains. Dans nos expérimentations, nous avons retenu les cultures primaires, pour des raisons techniques et biologiques. D'une part, il n'existe pas de lignées cellulaires immunitaires intestinales validées chez le lapin ou le porc. D'autre part, les cultures primaires, reflètent plus fidèlement l'hétérogénéité cellulaire, la différenciation tissulaire et les réponses immunitaires spécifiques de l'hôte, contrairement aux lignées cellulaires, peu représentatives du contexte physiologique (Chanput et al., 2015).

Parmi les cultures primaires, les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) sont souvent utilisées pour étudier la réponse immunitaire systémique, en raison de leur accessibilité. Toutefois, dans le cas des MOs, cette approche présente quelques limites. Après ingestion, environ 99 % des MOs atteignent le tractus intestinal, où près de 45 % sont métabolisés par le microbiote. Seuls 1 à 4 % des MOs sont excrétés dans les urines, tandis que 40 à 50 % sont retrouvés dans les fèces, témoignant de leur présence majoritaire dans l'intestin (Goehring et al., 2014). Ce gradient de distribution suggère que l'exposition des PBMCs aux MOs est faible. En complément, les PBMCs sont parfois utilisées comme modèle simplifié de la réponse immunitaire intestinale. Les PBMCs, bien que plus faciles d'accès, restent insuffisantes pour modéliser l'immunité digestive. En effet, les cellules immunitaires présentent une spécificité phénotypique forte selon leur tissu d'origine. Les PBMCs, issues de la circulation, sont composées majoritairement de cellules naïves, peu exposées aux signaux environnementaux, tandis que les cellules mononuclées de la *lamina propria* (LPMCs), situées dans la muqueuse intestinale, adoptent un phénotype effecteur et sont exposées en permanence aux antigènes alimentaires et microbiens. Les LPMCs présentent une proportion plus élevée de cellules productrices de cytokines, et expriment des marqueurs spécifiques de l'immunité digestive et une majorité de lymphocytes T mémoires (Burke Schinkel et al., 2024). Ainsi, bien que leur isolement soit techniquement plus complexe, nous avons choisi d'utiliser des LPMCs isolées du caecum de lapereaux, pour évaluer la réponse immunitaire digestive dans un tissu directement exposé aux MOs présents dans la lumière intestinale. Ce choix permet de capter une réponse plus physiologique, malgré les contraintes expérimentales associées.

### 2. La complexité d'obtention de LPMCs

L'isolement des cellules mononuclées de la *lamina propria* (LPMCs) intestinale nécessite des adaptations spécifiques en raison de la complexité du tissu intestinal, de la présence de mucus, de la diversité des populations immunitaires et de la nécessité de dissocier efficacement les cellules tout en préservant leur viabilité. Ainsi, l'isolement des LPMCs repose sur des étapes de digestion chimique et enzymatique qui doivent être rigoureusement optimisées afin d'éviter à la fois une dissociation incomplète du tissu et une dégradation excessive des cellules (Weigmann et al., 2007). Les protocoles doivent ainsi être ajustés aux spécificités d'espèces et de tissus, qui influencent des paramètres clés tels que la rigidité et

l'épaisseur de l'épithélium, la structure de la *lamina propria* ou encore la quantité de mucus. Ces caractéristiques imposant une adaptation fine du protocole, notamment sur la durée de la digestion chimique, les concentrations des réactifs nécessaires à l'élimination du mucus et des cellules épithéliales ainsi que la durée d'incubation enzymatique et la concentration en enzymes. Par exemple, chez le lapin, le caecum se distingue du colon par une muqueuse et une couche de mucus plus fines (Amiry et al., 2019).

Nous avons donc adapté, à partir de méthodes existantes, le premier protocole optimisé spécifiquement pour l'isolement des LPMCs du caecum de lapin. Ce dernier nous permet d'isoler un nombre suffisant de cellules viables. Ce mélange cellulaire est composé d'environ 15 % de cellules immunitaires CD45<sup>+</sup>, un marqueur exprimé sur toutes les cellules immunitaires nucléées (lymphocytes, monocytes, granulocytes), ce qui permet de distinguer efficacement les leucocytes des cellules non immunitaires. La majorité de ces cellules immunitaires sont des macrophages, des cellules dendritiques ainsi que des lymphocytes T et B, ce qui confirme que les types cellulaires isolés appartiennent bien à la *lamina propria* (Donovan and Koretzky, 1993). Ces expérimentations n'ont pas été réalisées chez le porc en raison de contraintes de temps.

### 3. Le choix des modalités d'expérimentation

Nous avons étudié l'effet des MOs sur les cellules immunitaires stimulées ou non. L'utilisation de deux types de stimulants repose sur leurs effets contrastés, permettant d'induire un large spectre de réponse. La PMA-ionomycin est connue pour stimuler les lymphocytes (Truneh et al., 1985) tandis que le LPS active l'immunité innée (Ciesielska et al., 2021). Il est important de considérer l'effet dose de chacun de ces stimulants, nous cherchons à induire une inflammation mais pas une toxicité ou un emballement de la réponse, ce qui empêcherait d'observer les effets des MOs. Dans le cas du LPS, la réponse varie en fonction du choix de la souche bactérienne dont il est issu en raison de la variabilité de structure moléculaire du LPS (Farhana and Khan, 2025). Nous avons choisi d'utiliser la souche O111 :B4, qui induit une réponse inflammatoire modérée (Hwang et al., 2016; Calatayud et al., 2019). Nous avons constaté un fort effet du temps ainsi qu'une interaction entre le stimulant et le temps, certains gènes étant exprimés précocement, et d'autres tardivement après la stimulation. De fait, nous avons choisi d'évaluer la réponse à deux temps, après 4 et 24 h de croissance.

Afin d'étudier les effets indirects des MOs sur les LPMCs, nous avons sélectionné certains métabolites produits par les bactéries étudiées à l'issue de la croissance avec les MOs. Notre choix s'est porté sur ceux dont la concentration était particulièrement importante par rapport à la croissance en présence de glucose pour l'ensemble des bactéries étudiées. Ainsi l'AGCC propionate était particulièrement abondant dans le surnageant de culture après culture avec les MOs chez les bactéries les métabolisant, de même que le BCFA isovalerate, indépendamment du MO étudié. Nous avons également choisi d'étudier l'isobutyrate et le 1,2-propanediol, leur production variant selon la structure du MO. Ils étaient en effet particulièrement produits lors de la croissance en présence du 2'-FL, avec des valeurs jusqu'à 3 fois plus élevées d'isobutyrate et de 12 à 29 fois plus élevées de 1,2-propanediol lors de la croissance avec le 2'-FL, par rapport aux autres MOs. De plus, le propionate est un métabolite

couramment étudié (Ciarlo et al., 2016), tandis que l'effet des BCFAs et du 1,2-propanediol sur l'immunité intestinale a été très peu étudié.

## II. L'exploitation des données de la littérature : un enjeu méthodologique face à la complexité des oligosaccharides du lait

La diversité structurale des MOs est aujourd'hui largement reconnue entre les espèces mammifères et au sein d'une même espèce, avec un nombre croissant de structures identifiées au fil des études (Jin et al., 2023). De plus, les MOs ont un rôle reconnu sur la santé du nouveau-né qui dépend de leur structure mais qui reste encore peu connu au regard de la diversité des MOs. L'analyse et la confrontation de l'ensemble des données disponibles dans la littérature scientifique pourraient permettre de mieux décrire l'ampleur de cette diversité. Toutefois, deux défis majeurs existent : la standardisation des connaissances et l'exploitation des données publiées. Par ailleurs, la littérature scientifique fait état de dénominations multiples, ambiguës ou incomplètes des MOs, rendant leur comparaison entre études particulièrement difficile. C'est dans ce contexte qu'intervient le développement du MilkOligoThesaurus, des guidelines d'annotation et du corpus annoté MilkOligoCorpus, outils conçus pour pallier les limitations actuelles et permettre une meilleure utilisation des connaissances existantes. Ils sont destinés à entraîner des outils automatiques d'extraction d'information afin de faire face à l'abondance des articles sur les oligosaccharides du lait. Ces outils ont été conçus pour la création, dans le cadre du projet ANR, d'une base de données alimentée automatiquement par text et data mining, à partir des données de la littérature.

### A. Comprendre la diversité des MOs : une nécessité biologique

#### 1. Une biodiversité encore sous-explorée

L'étude des MOs a révélé une grande diversité de structures dans le lait des mammifères, diversité qui reste largement inexplorée. Comme l'ont rapporté Jin et al. (2023), une part significative des MOs identifiés est encore peu caractérisée. Parmi les 6 500 espèces de mammifères, la composition du lait en MOs a été analysée dans seulement 106 espèces à ce jour. Les auteurs ont analysé 1902 études sur la composition en MOs du lait de mammifères, révélant que 80% des MOs décrits à ce jour couvrent seulement trois ordres taxonomiques : les primates (humains), les artiodactyles (animaux d'élevages) et les carnivores. Pourtant, les travaux de ces auteurs ont mis en évidence de nouvelles structures de MOs sulfatés et phosphorylés, dans les laits d'espèces peu étudiées comme l'alpaga, l'impala ou le dauphin. Plus du tiers des MOs fucosylés décrits dans cette étude sont des structures nouvelles, et parmi 60 structures caractérisées, 10 contiennent le motif LacdiNAc ( $\text{GalNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}$ ), rarement mentionné auparavant. Les oligosaccharides phosphorylés ont également été découverts dans le lait bovin dans l'étude de Gray et al. (2021), de même que des MOs contenant l'acide glucuronique.

Ces résultats soulignent l'importance de mieux comprendre cette diversité structurale et fonctionnelle, pour élucider les rôles biologiques spécifiques de ces MOs. Cette démarche nécessite de disposer d'outils analytiques puissants, capables d'extraire, d'identifier et de caractériser avec précision ces structures complexes. Le développement de telles approches est donc un préalable essentiel pour exploiter pleinement le potentiel des MOs.

## 2. Comprendre les facteurs de variation

Cette diversité ne peut être pleinement appréhendée sans prendre en compte les facteurs biologiques, techniques et écologiques qui influencent la composition du lait. Les techniques analytiques, les conditions de logement et d'alimentation, l'espèce, le stade de lactation, ou encore les conditions environnementales sont autant de paramètres ayant un impact sur les profils de MOs. Pour autant, pour la majorité des espèces, des facteurs pourtant fondamentaux, comme la génétique (Williams et al., 2021), n'ont pas été étudiés en lien avec les MOs, c'est notamment le cas chez le lapin et le porc. Certaines hypothèses tentent de relier la concentration ou la diversité des MOs à des facteurs écologiques ou évolutifs. Ces différences de concentration entre les espèces pourraient reposer sur une quantité plus importante de MOs dans les espèces vivant en groupe, afin de les protéger des échanges de microbiote potentiellement pathogènes entre individus (Tao et al., 2011). Cette hypothèse ne se vérifie cependant pas avec la forte quantité de MOs chez les ours, espèce solitaire, mais faible chez les lions qui vivent en groupe. Une autre hypothèse serait que la concentration en MOs est d'autant plus élevée que l'espèce est altriciale, donnant naissance à des nouveaux nés immatures, nécessitant d'importants soins à la naissance (Urashima et al., 2020). Les MOs pourraient également être impliqués dans l'adaptation du microbiote, comme proposé par Kijner et al. (2022b). Selon ces auteurs, les MOs soutiennent la mise en place du microbiote et la composition en MOs serait le produit de la sélection. Les MOs seraient d'autant plus variés dans une espèce que le microbiote serait diversifié, permettant de favoriser la croissance d'un grand nombre de microorganismes. Les variations intra-espèces seraient quant à elles le résultat de l'évolution, reflétant les défis auxquels chaque population a été confrontée, tels que les pathogènes présents et la disponibilité en nutriments. Enfin, des observations récentes suggèrent que les espèces sauvages présentent une plus grande diversité de MOs que les espèces domestiques, suggérant un rôle des conditions environnementales dans la sélection de ces oligosaccharides (Lundstrøm and Bojar, 2024).

Tous ces éléments plaident pour le développement d'une base de données dédiée, qui permettrait non seulement d'identifier les lacunes actuelles dans la recherche, mais aussi d'étudier les hypothèses évolutives ou écologiques en lien avec le rôle structure fonction de ces molécules.

### B. L'homogénéisation des dénominations : vers un langage commun

La littérature scientifique actuelle se caractérise par une grande hétérogénéité dans la désignation des MOs : les noms peuvent être triviaux, incomplets, ou fondés sur des hypothèses structurales (Urashima et al., 2018; Remoroza et al., 2020). En parallèle, l'information est dispersée dans des articles variés, présentée sous différentes formes (tableaux, textes, figures), et quand bien même le format des données est similaire, les symboles des figures peuvent varier, de même que la manière de décrire la composition. Cette hétérogénéité rend l'extraction manuelle des données fastidieuse et source d'erreurs. Face à ce constat, le MilkOligoThesaurus constitue une première réponse concrète, en permettant l'harmonisation des terminologies, issues de sources multiples. En regroupant les mentions de MOs dans une terminologie standardisée, il devient possible d'envisager la construction d'une base de données interrogeable permettant de regrouper en un seul point les

informations qualitatives, quantitatives et contextuelles (métadonnées biologiques) sur les MOs décrits.

### C. La nécessité d'une annotation guidée et contextualisée

Des bases de données comme MilkOligoDB (Durham et al., 2023) ou celle développée par Jin et al. (2023) couvrent déjà cette tâche de regroupement des structures de MOs, mais elles ont été réalisées manuellement, sans possibilité d'actualisation automatisée et n'intègrent pas les métadonnées biologiques ou expérimentales, pourtant essentielles à l'interprétation. Face à l'augmentation constante du nombre de publications scientifiques sur les MOs, une telle infrastructure numérique est devenue indispensable, pour faciliter l'extraction, la normalisation et l'analyse des données, dans une logique de science ouverte. Les méthodes de text et data mining offrent ici des perspectives puissantes, à condition de disposer de corpus d'entraînement fiables.

Dans ce contexte, nous avons développé un corpus annoté manuellement, le MilkOligoCorpus. L'objectif de cette annotation est double : identifier les structures de MOs et relier ces structures à leur contexte biologique et écologique. Nous avons également développé les premières guidelines sur l'annotation des MOs, qui sont des instructions visant à indiquer aux annotateurs la façon d'appliquer le schéma d'annotation aux données textuelles (Pustejovsky and Stubbs, 2013), disponibles à l'ensemble de la communauté scientifique afin de permettre l'interopérabilité. Ce travail d'annotation, couvrant à la fois la biodiversité, les métadonnées maternelles et les facteurs exogènes, constitue un préalable indispensable à l'entraînement d'algorithmes d'extractions automatiques. L'annotation manuelle par des experts du domaine est particulièrement nécessaire dans les domaines où les concepts sont mal définis ou ambigus (Abdullah et al., 2024), tels que les MOs. Le MilkOligoCorpus contient un petit nombre de textes, mais comme l'indiquent Pustejovsky et Stubbs (2013) dans leur manuel d'annotation du langage naturel, les guidelines d'annotation sont souvent plus importantes que le volume de données annotées. De plus, les premières analyses sur les 30 textes ont donné des résultats satisfaisants, ce qui suggère qu'en poursuivant son développement, l'outil pourra atteindre un niveau de performance élevé.

Ce travail de thèse a permis de développer deux outils, MilkOligoThesaurus et MilkOligoCorpus pour amorcer une démarche de text et data mining en vue de constituer une base de données dédiée aux MOs. L'intégration systématique de métadonnées offre la possibilité de comparer les études entre elles tout en prenant en compte les variables contextuelles susceptibles de biaiser les interprétations. Bien que le corpus soit encore restreint, les premières analyses ont montré des performances prometteuses, témoignant de la pertinence des approches employées. Par ailleurs, ces outils conçus pour être réutilisables et évolutifs, permettront de mettre en place des protocoles d'actualisation continue des connaissances sur les MOs, ce qui est essentiel au regard du rythme soutenu des publications scientifiques identifiant de nouveaux composés. Enfin, cet outil représentera une avancée significative, car il centralisera une large quantité d'informations disparates et permettra de les croiser, facilitant une vision intégrée des informations.

### III. Effets des oligosaccharides du lait sur les bactéries commensales nouvellement isolées

Nos travaux ont mis en avant la capacité de certaines souches bactériennes intestinales commensales, isolées chez des porcelets et lapereaux, à dégrader divers oligosaccharides du lait. Cette dégradation est à la fois espèce bactérienne-spécifique et structure-dépendante. Avant d'étudier leurs fonctions, il est essentiel de discuter des stratégies d'isolement mises en œuvre pour obtenir ces souches représentatives du microbiote intestinal, des limites méthodologiques rencontrées, ainsi que des pistes d'amélioration envisageables.

#### A. Isolement des bactéries

##### 1. Stratégies d'isolement bactérien : choix des milieux et ajustements méthodologiques

L'isolement de bactéries intestinales est particulièrement complexe, en raison de la diversité métabolique des espèces, de leurs exigences de croissance strictes et du manque de protocoles standardisés (Tramontano et al., 2018). Afin d'isoler des bactéries commensales représentatives du microbiote de porcelets et de lapereaux, nous avons mis en place une stratégie combinant milieux riches et sélectifs.

Les milieux de culture riches fournissent les éléments essentiels à la croissance d'un large éventail de bactéries pour répliquer la composition nutritionnelle de l'environnement intestinal, tandis que les milieux de culture sélectifs contiennent des inhibiteurs spécifiques permettant de restreindre la croissance aux bactéries ciblées (Harrigan, 1998). Nous avons utilisé trois milieux riches, le BHIS, le RCM et le GAM et trois milieux sélectifs, le MRS, le BBE et le LKV. Le MRS, classiquement utilisé pour l'isolement du genre *Lactobacillus* (famille *Lactobacillaceae*) (Reuter, 1985), a montré une efficacité limitée dans notre étude avec seulement 33 % d'isolats appartenant à la famille *Lactobacillaceae* (phylum *Bacillota*) chez le porc, comme observé par Wang et al. (2021), qui ont isolé seulement 55% de l'ensemble des *Lactobacillus* isolées dans leur étude avec ce milieu. De même, ce milieu a favorisé les genres *Escherichia* (famille *Enterobacteriaceae*) et *Streptococcus* (famille *Streptococcaceae*) dans notre étude, ainsi que dans celle de Wang et al. (2021). Le milieu BBE, bien qu'employé pour sélectionner le genre *Bacteroides* (famille *Bacteroidaceae*) (Lyznicki et al., 1982), n'a permis d'en isoler aucun chez le lapin et le porc dans notre étude, ce qui avait déjà été constaté par Wang et al. (2021) chez le porc. A l'inverse, le milieu LKV, enrichi en vancomycine et kanamycine limitant les bactéries à Gram + (van Winkelhoff and de Graaff, 1983), a permis d'isoler des bactéries du genre *Bacteroides* (famille *Bacteroidaceae*) chez le lapin tandis que chez le porc des bactéries appartenant aux genres *Escherichia* (famille *Enterobacteriaceae*) et *Faecalicoccus* (famille *Enterococcaceae*) ont également été obtenues avec ce milieu.

Par ailleurs, les difficultés techniques ont différencié entre nos modèles. Chez le lapin, les premiers essais ont révélé une croissance dominante des bactéries de la famille *Enterobacteriaceae* (phylum *Proteobacteria*), dont la prolifération rapide dans les milieux de culture riches mais aussi sélectifs a vraisemblablement limité la croissance d'autres groupes bactériens d'intérêts. L'ajout de colistine, efficace contre les bactéries à Gram –, a permis de réduire l'abondance des *Enterobacteriaceae*, mais a conduit à une prolifération des bactéries de la famille

*Enterococcaceae* (phylum *Bacillota*). Nous avons alors complété le mélange avec de la vancomycine et de l'ampicilline, ce qui a permis de réduire la pression compétitive des *Enterobacteriaceae* et *Enterococcaceae*, favorisant l'émergence de souches d'intérêt telles que celles appartenant à la famille *Bacteroidaceae* (phylum *Bacteroidota*). A l'inverse, chez le porc, aucun antibiotique n'a été ajouté puisque la pression de certaines souches était moins forte. Ce contraste méthodologique est important à prendre en compte dans l'interprétation de nos résultats. Chez le porc, le principal obstacle a été la faible efficacité d'amplification de l'ADNr 16S des isolats, nous amenant à adapter nos méthodes d'amplification. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces échecs :

- Une concentration trop élevée d'ADN, partiellement résolue par dilution ;
- La présence d'inhibiteurs de PCR, comme des débris cellulaires, des polysaccharides ou autres composés présents dans les fèces (Lantz et al., 1997) qui peuvent interférer avec l'activité de la polymérase ou se lier à l'ADN, compromettant ainsi l'amplification (Schrader et al., 2012), comme cela a été montré pour l'identification de *Clostridium botulinum* (famille *Clostridiaceae*) dans les fèces de porcs (Dahlenborg et al., 2001) ;
- Une lyse incomplète de certaines bactéries, en particulier chez des espèces à paroi épaisse (de Boer et al., 2010), comme certaines bactéries du phylum *Bacillota*, prépondérantes chez le porc (Frese et al., 2015), justifiant l'emploi complémentaire de lyse mécanique par broyage à billes.

Malgré ces ajustements, de nombreux isolats porcins n'ont pas pu être identifiés à ce jour. La différence de nature des échantillons utilisés, caecum chez le lapin et fèces chez le porc, ainsi que la différence de composition du microbiote, avec une abondance de *Bacillota* chez le porc, pourraient expliquer la plus forte abondance de ces difficultés d'amplification chez le porc. Cela souligne la nécessité d'améliorer les protocoles de lyse et d'extraction.

## 2. Représentativité des isolats par rapport au microbiote de nos animaux modèles

Les 148 souches isolées chez des lapereaux âgés de 16 à 23 jours d'âge appartiennent majoritairement aux phylums *Bacteroidota* (48% des isolats), *Pseudomonadota*, anciennement *Proteobacteria* (36% des isolats) et *Bacillota*, anciennement *Firmicutes* (16% des isolats). Ces proportions reflètent globalement les profils du microbiote caecal décrits à 18-19 jours d'âge, les *Bacteroidota* étant dominantes (Read et al., 2019; Paës et al., 2022; Zhao et al., 2024). Le genre *Bacteroides* représente à lui seul 42 % des isolats, en accord avec les études identifiant ce genre comme dominant à 18-19 jours. En revanche, certains genres ou familles attendus, comme le genre *Alistipes* (famille *Rikenellaceae*) ou la famille *Lachnospiraceae* (phylum *Bacillota*), sont sous représentés, représentant 1 et 3 % de nos isolats, respectivement, bien qu'ils soient dominants à 19 et 25 jours d'âge (Mattioli et al., 2019; Beaumont et al., 2021; Zhao et al., 2024). De même, dans nos isolats, les bactéries de la famille *Enterobacteriaceae* (phylum *Pseudomonadota*) sont sur représentées avec 36 % d'abondance relative contre 4 % à 14 jours dans les études sur le microbiote caecal (Combes et al., 2014). Malgré cela, nos isolats contiennent un représentant de chaque famille majoritaire de la communauté microbienne caecale des lapereaux.

Chez les porcelets de 4 semaines d'âge, la caractérisation du microbiote fécal par séquençage de l'ADNr 16S des fèces, indique une dominance des phylum *Bacillota* (54 % des isolats),

*Bacteroidota* (39 % des isolats) et *Pseudomonadota* (4 % des isolats) (Pajarillo et al., 2014). Les résultats de nos isollements montrent également une dominance des *Bacillota* (49 % des isolats), mais des proportions inversées pour *Bacteroidota* (12 % des isolats) et *Pseudomonadota* (39 % des isolats), qui s'explique par une surreprésentation de genres comme *Escherichia* (phylum *Pseudomonadota*), qui représente 37 % de nos isolats. Les *Lactobacillaceae*, attendues comme majoritaires dans le microbiote fécal à 20 jours d'âge (Petri et al., 2010; Bian et al., 2016), ne représentent que 16 % de nos isolats, deuxième famille majoritaire après les *Enterobacteriaceae* (37% des isolats). Selon Motta et al. (2019), les bactéries de la famille *Bacteroidaceae* (phylum *Bacteroidota*) sont majoritaires alors qu'elles ne représentent que 11 % des isolats de notre étude. Le genre *Bacteroides* (famille *Bacteroidaceae*), majoritaire dans le microbiote de porcelets non sevrés (Pajarillo et al., 2014), ne représente que 10 % de nos isolats, en incluant *Phocaeicola* anciennement *Bacteroides*. Il faut tout de même noter que dans l'étude de Pajarillo et al. (2014), l'espèce majoritaire est *Phocaeicola vulgatus*, dont nous avons obtenu 7 isolats sur les 92. Le genre *Prevotella* (famille *Bacteroidota*) est absent de nos isolats, ce qui n'est pas surprenant, car sa présence chez le porcelet avant le sevrage varie fortement selon les études. Dans l'étude de Frese et al. (2015) les *Prevotella* ne sont présents qu'en faible quantité, tandis que dans l'étude de Wang et al. (2021), 4% de *Prevotella* sont détectées à 20 jours d'âge et dans l'étude de Chen et al. (2017) les *Prevotella* représentent un genre important chez les porcelets avec une forte variabilité entre individus. En outre, plusieurs études ont rapporté la difficulté à isoler *Prevotella* en culture pure (Wang et al., 2019b; Dong et al., 2022). Ainsi, chez des porcs adultes, Fenske et al. (2020), n'ont isolé que 7 *Prevotella* parmi les 500 isolats alors que ce genre était le plus abondant (38 %) avec une approche de métagénomique des mêmes porcs. Les auteurs supposent qu'un milieu contenant des fibres alimentaires serait plus adapté à ce genre bactérien, qui augmentent chez le porc après introduction d'aliment solide. Ainsi, les isollements nous ont permis de capter une partie de la diversité du microbiote du porc. Parmi nos isolats de porcelets certains genres sont surreprésentés par rapport aux microbiote fécal, ce qui réduit la représentativité de nos isollements. Il se peut que l'optimisation de l'amplification de l'ADN ribosomal 16S nous permette d'obtenir des isolats plus représentatifs du microbiote fécal de porcelets.

Les différences observées entre les analyses métagénomiques et nos isolats pourraient s'expliquer par les conditions de transport et de culture. Les prélèvements de caecum de lapin et de fèces de porcelet ont été acheminés au laboratoire dans un délai respectif de 48 h et 24 h. Malgré l'utilisation de kits de collecte conçus pour le microbiome anaérobie, un contact avec l'oxygène, même transitoire, n'est pas exclu (Martínez et al., 2019). Par ailleurs, le transport a été réalisé à température ambiante, conformément aux recommandations du kit. Or, plusieurs travaux ont souligné l'impact négatif d'un stockage à température ambiante sur la représentativité du microbiote (Roesch et al., 2009; Choo et al., 2015). A l'inverse, une congélation immédiate à -80°C est fortement recommandée pour préserver la diversité bactérienne (Fouhy et al., 2015), et pourra donc être envisagée pour de futures expérimentations. Ces conditions peuvent avoir favorisé la croissance de bactéries tolérant de faibles concentrations d'oxygène (anaérobies modérées), au détriment des anaérobies strictes, qui constituent pourtant une fraction importante du microbiote intestinal. De même,

au cours de la culture, chez le porc, Fenske et al. (2020) ont montré que la composition des isolats bactériens obtenus pouvait différer significativement de celle révélée par les approches métagénomiques, en raison des propriétés sélectives des milieux de culture utilisés. De telles différences ont également été rapportées par Wang et al. (2021), qui soulignent que les phylums dominants diffèrent : les *Bacillota* et *Bacteroidota* sont les phylums dominants en métagénomique contre *Bacillota* et *Pseudomonadota* en culture.

## B. Culture en présence de MOs

### 1. Choix des souches évaluées en présence de MOs

Le choix des souches testées pour leur capacité à utiliser les MOs a été guidé par leur représentativité dans le microbiote intestinal des espèces étudiées (lapin, porc), ainsi que par les données disponibles sur la dégradation des MOs. Chez le lapin, les *Lachnospiraceae* (phylum *Bacillota*), représentées dans notre étude par *Hungatella hathewayi*, sont des membres dominants du microbiote caecal des lapereaux (Paës et al., 2022), mais peu de données existent sur leur interaction avec les MOs. Etudier leur capacité à dégrader les MOs permet donc d'explorer de nouveaux candidats potentiels dans cette fonction. Par ailleurs deux souches de *Lactobacillus* (famille *Lactobacillaceae*), isolées chez le porc, ont été incluses, bien qu'elles disposent de peu d'enzymes connues pour hydrolyser les MOs. Ces bactéries jouent, en effet, un rôle clé dans le microbiote des porcelets et sont souvent associées à des effets probiotiques bénéfiques (Bian et al., 2016; Valeriano et al., 2017). De même, leur capacité à utiliser les MOs reste controversée dans la littérature, certains travaux leur attribuant une faible activité hydrolytique, tandis que d'autres montrent une croissance en présence de certains MOs (Yu et al., 2013; Thongaram et al., 2017; Salli et al., 2021). Enfin, parmi les 9 isolats sélectionnés, 6 appartiennent au genre *Bacteroides* (dont 2 *Phocaeicola* anciennement classifiées *Bacteroides*), pour lesquels la capacité à dégrader les MOs est bien documentée dans la littérature (Marcobal et al., 2011; Yu et al., 2013; Salli et al., 2021; Kijner et al., 2022a). Leur utilisation des MOs est donc attendue, contrairement aux 3 autres isolats pour lesquels cette capacité reste plus incertaine.

### 2. Une croissance qui dépend de la structure des oligosaccharides du lait

Dans nos essais, parmi les trois genres étudiés, seuls les *Bacteroides* ont montré une capacité à dégrader les MOs, à l'exception de *B. uniformis*. Ces résultats étaient attendus. En effet, la similarité de structure des MOs avec certains glycoconjugués de la mucine intestinale, favoriserait la prolifération des *Bacteroides*, bactéries spécialisées dans l'utilisation de ces substrats (Marcobal et al., 2011). Le 2'-FL a systématiquement augmenté la croissance des bactéries capables de dégrader les MOs, en comparaison avec les autres MOs testés, LNT, 3'-SL et 6'-SL (Tableau 9). C'est particulièrement le cas pour *B. thetaiotaomicron* et *Bacteroides* sp.D2 dont la biomasse maximale à l'issue de la croissance en présence de 6'-SL est inférieure de 54 % et 62 % par rapport à celle en présence du 2'-FL, respectivement. Cependant, le 2'-FL est absent du lait de lapine (données non publiées) et présent en quantité très faible dans le lait de truie (Albrecht et al., 2014; Mudd et al., 2016; Salcedo et al., 2016). On peut donc supposer que les MOs présents dans le lait des animaux domestiques ne sont pas favorables aux bactéries adaptées à la dégradation des MOs fucosylés. Ce phénomène aurait également lieu chez l'homme, le 2'-FL étant absent du lait des mères non sécrétrices (Thurl et al., 2017).

La différence de dégradation selon les types de MOs est également perceptible au travers des analyses RMN indiquant le pourcentage de consommation des MOs. Chez certaines espèces, les différences de dégradation selon la structure des MOs sont particulièrement visibles. Il semblerait que 3'-SL et 6'-SL respectivement, soient mieux consommés par *P. vulgatus* et *Bacteroides* sp. 3\_1\_33\_FAA, qui seraient donc favorisées par le lait de nos animaux modèles, dans lesquels les MOs sialylés dominent, que par *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* ou *Bacteroides* sp.D2 (Tableau 9).

### 3. Mécanisme d'interaction avec les MOs

L'analyse des génomes entiers nous a permis d'identifier les gènes codant pour les enzymes impliquées dans la dégradation des MOs des bactéries étudiées.

#### i. Différence d'affiliations bactériennes

Afin d'obtenir une première identification taxonomique des isolats bactériens, nous avons d'abord séquencé l'intégralité de l'ADNr 16S. Cette approche permet une classification relativement fiable à l'échelle du genre, mais elle présente des limites lorsqu'il s'agit de discriminer des espèces étroitement apparentées, même avec le gène complet, en raison de fortes similarités de séquences (Ranjan et al., 2016; Johnson et al., 2019). Les bactéries utilisées en culture avec des MOs ont été sélectionnées sur la base des résultats de l'affiliation taxonomique utilisant le séquençage de l'ADNr 16S. La caractérisation plus approfondie par séquençage du génome entier nous a permis d'affiner l'affiliation taxonomique à l'échelle des espèces et des souches. Pour deux isolats initialement identifiés comme *NQMG\_s* et *Phocaeicola dorei*, l'analyse du génome entier a révélé une affiliation différente à l'échelle de l'espèce, *Bacteroides* sp.D2 et *Bacteroides* sp 3\_1\_33FAA respectivement, que celle suggérée par le séquençage de l'ADNr 16S. De plus, pour quatre autres isolats (*B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *Lactobacillus amylovorus* et *Limosilactobacillus mucosae*), le séquençage du génome entier a permis de distinguer des différences à l'échelle de la souche par rapport à l'affiliation taxonomique basée sur le séquençage de l'ADNr 16S. Au-delà de l'identification taxonomique, le séquençage du génome complet nous a également permis d'explorer le potentiel fonctionnel de ces isolats, en identifiant les gènes impliqués dans le métabolisme des oligosaccharides. Cette étape était essentielle pour interpréter nos résultats de croissance en présence de MOs et pour confirmer ou reconsidérer certaines hypothèses formulées à partir des tests phénotypiques.

#### ii. Identification des enzymes impliquées dans la dégradation des MOs

Nos études ont révélé la présence de nombreuses glycosides hydrolases dans le génome des espèces capables de dégrader les MOs. A l'inverse, les *Lactobacillus*, incapables de dégrader les MOs de notre étude, ne possédaient aucune GH connue pour être impliquée dans la dégradation des MOs. Nous n'avons pas réussi à extraire l'ADN de *B. uniformis*, il pourrait être intéressant de persévérer puisque parmi toutes les *Bacteroides* de notre étude, c'est la seule espèce qui n'a pas été capable d'utiliser les MOs. Il serait donc intéressant de voir si cela est dû à l'absence de GHs dans son génome. *H. hathewayi*, malgré la présence dans son génome de nombreuses GHs potentiellement impliquées dans la dégradation des MOs, n'a montré aucune croissance avec ces substrats. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce paradoxe :

- La spécificité enzymatique : chaque famille de GH regroupe des enzymes aux substrats et mécanismes variés. Par exemple, la famille GH20 comprend des  $\beta$ -hexosaminidases hydrolysant des résidus GlcNAc et GalNAc terminaux, des exo- $\beta$ -D-glucosaminidases qui retirent les résidus glucosamine (GlcN), des N-acetyl- $\beta$ -D-Galactosaminidases qui hydrolysent les résidus GalNAc, mais seules les lacto-N-biosidases sont directement impliquées dans la dégradation du LNT en lacto-N-biose (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc) (CAZy - GH20, 2025). Si *H. hathewayi* possède des GH20 non spécifiques aux MOs, cela expliquerait l'absence de croissance.
- La localisation des enzymes : l'activité enzymatique peut être extracellulaire ou intracellulaire (Kiely et al., 2023). Si les enzymes sont intracellulaires mais que la bactérie ne dispose pas des transporteurs adaptés pour importer les MOs, l'hydrolyse ne peut avoir lieu. L'analyse des séquences protéiques permettrait d'identifier des peptides signal N-terminaux ou des domaines transmembranaires C-terminaux, marqueurs de la localisation cellulaire (Turroni et al., 2010), pour vérifier cette hypothèse.
- Une expression génique régulée : la présence d'un gène n'implique pas son expression. Des facteurs environnementaux peuvent moduler l'expression des GHs (McKee et al., 2021).

#### 4. Produits de dégradation des MOs

##### i. Monosaccharides libérés par l'hydrolyse des MOs

Après dégradation des MOs, les bactéries peuvent soit métaboliser les monosaccharides libérés, soit les laisser dans le milieu si elles ne possèdent pas la machinerie enzymatique nécessaire à leur métabolisation. L'analyse par RMN a permis de quantifier les monosaccharides présents dans le surnageant en phase stationnaire de croissance. La dégradation du 2'-FL par *B. thetaiotaomicron*, *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA et *P. vulgatus* conduit à une accumulation importante de fucose dans le milieu. De même, la croissance en présence de MOs sialylés (3'-SL ou 6'-SL) entraîne la libération d'acide N-acétylneuraminique, en quantités variables selon la souche. *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA et *P. vulgatus* en libèrent de fortes concentrations, tandis que les surnageants de *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* et *Bacteroides* sp.D2 en contiennent environ 4 fois moins. Ces résultats doivent être interprétés à la lumière des niveaux de consommation des MOs. En effet, *Bacteroides* sp. 3\_1\_33FAA et *P. vulgatus* sont les plus grandes consommatrices de 6'-SL et 3'-SL respectivement. Ainsi, la forte concentration de NeuAc dans le surnageant pourrait refléter une consommation accrue de MOs sialylés par ces bactéries et non une moindre utilisation du NeuAc.

En revanche, aucun N-acétylglucosamine (GlcNAc) n'a été détecté dans les milieux après croissance avec le LNT. L'analyse du génome de l'ensemble des bactéries capables de dégrader les MOs révèle l'absence de lacto-N-biose phosphorylase (GH112) (Figure 29), enzyme permettant l'hydrolyse de la liaison entre Gal et GlcNAc dans les MOs de type I (Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc) comme le LNT. En revanche, toutes possèdent des lacto-N-biosidases, capables de cliver la liaison entre le GlcNAc et le lactose, libérant alors du lacto-N-biose (Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc) (Ioannou et al., 2021). Ce disaccharide n'étant pas détectable par notre méthode RMN, il n'est

pas possible de déterminer si l'absence de GlcNAc dans le surnageant résulte de sa métabolisation ou simplement de son absence de libération.

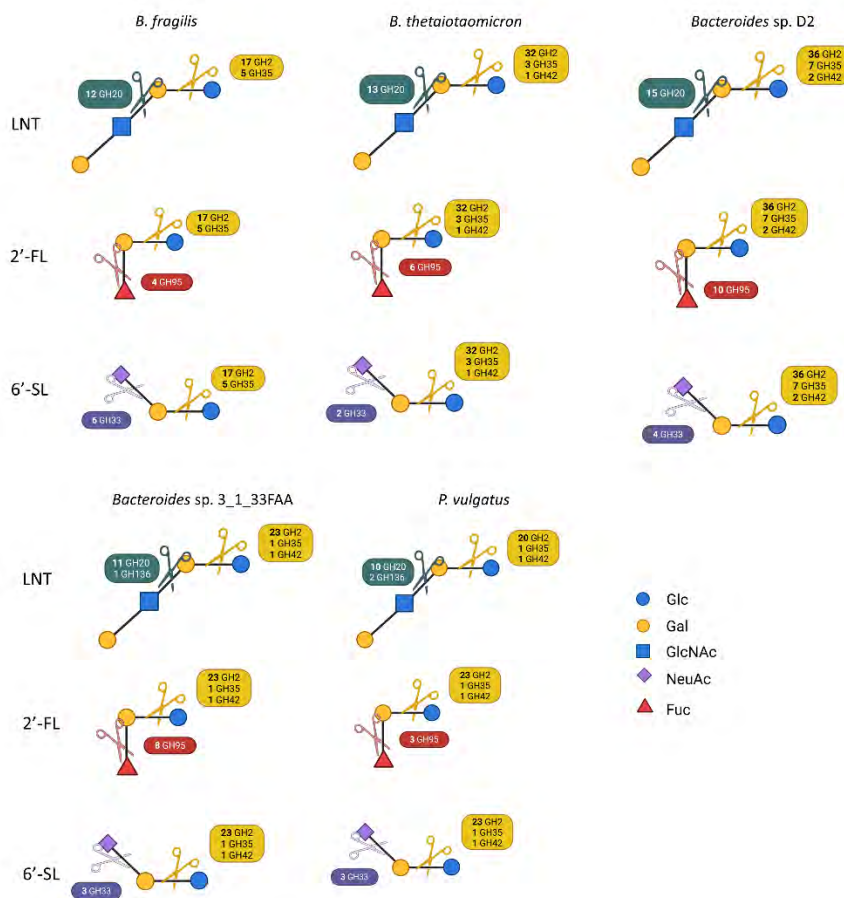


Figure 29 : Glycosidases (GHs) présentes dans le génome des souches capables de dégrader les MOs. Les ciseaux indiquent les liaisons où sont actives les GHs associées à la couleur.

Enfin, les monosaccharides libérés, tels que le fucose et l'acide sialique, pourraient constituer des ressources métaboliques pour d'autres bactéries dépourvues de la machinerie enzymatique nécessaire à la dégradation initiale des MOs, comme discuté dans la partie V.

## ii. Produits de la métabolisation des MOs

Nos résultats montrent que les bactéries dégradent les MOs, mais sont également capables de les métaboliser (Tableau 9). Nous avons observé des différences notables de profils métaboliques au sein d'une même espèce, selon la structure des MOs. Ainsi, le 2'-FL stimule plus fortement la production d'isobutyrate et 1,2-propanediol. Les cultures ont été réalisées dans un milieu défini (YCFA sans AGCCs), permettant de mettre en évidence une production accrue de certains métabolites en présence de MOs par rapport au glucose, notamment les acides gras à chaînes ramifiées (BCFAs), issus du catabolisme des acides aminés à chaînes ramifiées, présents dans le milieu (Duncan et al., 2009). Cependant, l'environnement intestinal étant bien plus complexe, dynamique et soumis à des variations constantes, il est probable que les métabolites réellement retrouvés *in vivo* diffèrent de ceux observés dans notre système expérimental (Kennedy et al., 2023). De plus, certains de ces métabolites peuvent également être consommés par d'autres bactéries du microbiote intestinal comme décrit par la suite (V).

Par ailleurs, les bactéries présentent une hiérarchie dans l'utilisation des substrats, préférant d'abord ceux qu'elles jugent les plus accessibles ou énergétiquement avantageux (Fondi et al., 2016). Cette priorité pourrait expliquer l'utilisation accrue des acides aminés à chaînes ramifiées dans les cultures sur MOs, les acides aminés étant possiblement plus rapidement mobilisables que les MOs complexes. Ce phénomène pourrait également justifier le délai observé dans la croissance bactérienne en présence de MOs par rapport au glucose. Ce comportement hiérarchique d'utilisation des substrats a été bien documenté chez *B. thetaiotaomicron* et *B. ovatus*, deux espèces du genre *Bacteroides* qui diffèrent par l'ordre de préférence des sucres, soulignant l'adaptation spécifique de chaque espèce à son environnement et à ses ressources (Rogers et al., 2013; Tuncil et al., 2017).

Tableau 9 : Bilan des effets des oligosaccharides du lait sur le microbiote intestinal de nos espèces modèles, porcs et lapins. Le symbole + signifie la présence d'effet dont l'importance augmente avec le nombre de +, le symbole ± indique un effet partiel, le symbole – indique l'absence d'effet. LNT : lacto-N-tetraose, 2'-FL : 2'-fucosyllactose, 6'-SL : 6'-sialyllactose, 3'-SL : 3'-sialyllactose.

	Croissance			Consommation			Libération de monosaccharides			Production de métabolites		
	LNT	2'-FL	3'-SL 6'-SL	LNT	2'-FL	3'-SL 6'-SL	LNT	2'-FL	3'-SL 6'-SL	LNT	2'-FL	3'-SL 6'-SL
<i>B. fragilis</i>	++	+++	++	+++	++	+	-	+	++	+	++	+
<i>Bacteroides</i> sp. D2	+	++	-	+	+	-	-	-	±	+	++	+
<i>B. thetaiotaomicron</i>	+	+++	+	++	+++	+	-	++	+	+	++	+
<i>Bacteroides</i> sp 3_1_33FAA	++	+++	++	+++	+++	++++	±	+++	+	+	++	+
<i>P. vulgatus</i>	+	++	+	++	++	+++	±	+++	+	+	++	+

Nos travaux ont permis d'isoler et de caractériser un ensemble de nouvelles souches bactériennes intestinales issues de lapereaux et de porcelets, et d'évaluer leur capacité à utiliser trois types de MOs, différant par leur structure. Cette approche fonctionnelle ciblée a confirmé une dégradation structure-dépendante des MOs par les bactéries. Cette étude à l'échelle des souches constitue une première étape vers la compréhension des effets des MOs sur le microbiote intestinal de lapereaux et porcelets.

#### IV. Effets des oligosaccharides du lait sur l'immunité

##### A. Développement d'outils pour l'étude de la réponse immunitaire mucoale

Dans les études actuelles, l'effet immunomodulateur des MOs a été étudié sur les cellules intestinales épithéliales ou les cellules sanguines (PBMCs). Cependant aucune étude ne s'est intéressée aux effets sur les cellules immunitaires intestinales. Nous avons consacré un travail spécifique à la mise au point d'un protocole d'isolement, de culture et de stimulation des cellules mononuclées de la *lamina propria* du caecum de lapin. Ce modèle *in vitro* présente un intérêt majeur pour explorer les effets des composés nutritionnels sur l'immunité intestinale. Le protocole mis au point a permis d'obtenir un rendement cellulaire satisfaisant (de 500 000 à 13 millions de cellules par g de tissu caecal), une viabilité élevée après isolement et en culture, et une réponse immunitaire à la stimulation significative en culture, comme l'a montré la réponse transcriptionnelle à différents stimulants immunitaires (LPS et PMA-

ionomycine). Le développement d'un tel modèle nous a permis d'étudier la réponse des LPMCs aux MOs. L'utilisation d'un modèle basal (sans stimulation) et d'un modèle de stimulation permet d'étudier deux phénomènes, (i) le développement des cellules immunitaires dans le modèle basal et (ii) la capacité à inhiber, ou au contraire accentuer, la réponse immunitaire et/ou inflammatoire induite par le stimulant en conditions stimulées. De plus, l'utilisation de deux types de stimulants, LPS et PMA-ionomycine nous ont permis d'induire des réponses différentes, inflammatoire pour le LPS et stimulatrice des lymphocytes pour la PMA-ionomycine. La mise au point de ce modèle chez le lapin représente un apport méthodologique important, dans un contexte où peu de données sont disponibles sur l'immunité intestinale de cette espèce. Ce dispositif expérimental présente toutefois certaines limites. Le nombre de cellules isolées est fortement variable entre les individus et ne peut pas être contrôlé. La majorité des cellules ne sont pas des cellules immunitaires mononuclées, qui peuvent donc avoir un impact en culture et potentiellement diluer l'effet des MOs sur les cellules immunitaires.

## B. Les oligosaccharides du lait exercent un faible effet direct sur la réponse immunitaire

### 1. Effets limités des oligosaccharides du lait sur l'expression génique immunitaire de la muqueuse intestinale

Dans notre étude, les MOs n'avaient que peu d'effets immunomodulateurs sur les cellules immunitaires de la muqueuse intestinale (Figure 30). Aucune expression de gènes n'était significativement régulée à la hausse par le LNT. En revanche, le 6'-SL semblait activer faiblement l'immunité innée, comme en témoigne une légère augmentation de l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires (IL1B, IL6, CXCL8), de chimiokines (CXCL10) et de marqueurs d'activation cellulaire (CD69, IL2RA). Toutefois, cette régulation reste modeste (moins de 2 fois supérieure aux cellules en condition contrôle) et sans co-régulation cohérente de gènes appartenant à une même voie immunitaire, limitant la portée fonctionnelle de ces observations. De même, le traitement avec le 2'-FL montre une modulation fonctionnelle dispersée et faible. L'expression de certains gènes inflammatoires (IL1B, IL6, TNF), régulateurs (IL10) ou d'activation cellulaire (CD69, IL2RA, CD80) est faiblement régulée, mais aucun cluster transcriptionnel cohérent n'émerge. En conditions inflammatoires, induites par le LPS ou la PMA-ionomycine, les MOs modulent très peu de gènes et leurs effets semblent aller dans le même sens que le stimulant, sans atténuer la réponse inflammatoire. Par exemple, l'expression d'IL1RN, inhibiteur naturel de la voie IL-1, est significativement plus réduite par le traitement que par le LPS seul, ce qui pourrait accentuer la réponse inflammatoire.

### 2. Hypothèses méthodologiques expliquant les divergences avec la littérature

Ces résultats contrastent fortement avec les études menées sur des lignées cellulaires ou des PBMCs, dans lesquelles les MOs exercent un fort effet immunomodulateur, notamment en réduisant l'inflammation induite par le LPS (Xiao et al., 2019; Zhang et al., 2019a; Boll et al., 2024). Plusieurs facteurs expérimentaux peuvent expliquer ces divergences. Tout d'abord notre modèle utilise des cellules immunitaires issues de la *lamina propria* intestinale (LPMCs), et non des PBMCs circulants, utilisées dans les études antérieures. Or les populations cellulaires y sont très différentes, les leucocytes, largement majoritaires dans les PBMCs (environ 80%), ne représentent qu'environ 20 % des LPMCs (Pasternak, 2014). Dans notre

modèle, nous avons montré que les LPMCs contiennent 16 % de cellules CD45<sup>+</sup>. Chez le porc, les PBMCs contiennent 7.2 % de cellules myéloïdes contre seulement 0.7 % dans les LPMCs, 27,8 % de lymphocytes B alors qu'ils sont absents des LPMCs (0.3%) et 27.8 % de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> contre 2.7 % dans les LPMCs. A l'inverse, les lymphocytes T cytotoxiques sont plus abondants dans les LPMCs (54.1 %) que dans les PBMCs (9.1 %) (Pasternak, 2014). Ces différences de composition cellulaire pourraient fortement conditionner la réponse immunitaire observée. Aussi, il reste difficile d'estimer précisément à quelles concentrations de MOs les cellules immunitaires sont réellement exposées *in vivo*. Dans la majorité des études *in vitro*, y compris la nôtre, les concentrations de MOs utilisées sont supérieures aux niveaux physiologiques, notamment puisqu'on estime qu'à peine 1 à 4 % des MOs ingérés sont absorbés (Goehring et al., 2014). De même, pour que les LPMCs soient exposées aux MOs en conditions physiologiques, ces derniers doivent d'abord franchir la barrière épithéliale. Seules les cellules dendritiques sont capables d'accéder directement à la lumière intestinale en traversant l'épithélium (Rescigno et al., 2001). Ainsi, les doses effectivement accessibles aux LPMCs sont probablement faibles, et encore moindres pour les cellules circulantes, qui ne sont exposées qu'à la fraction systémique des MOs. Ces considérations renforcent l'idée que les effets observés dans les modèles *in vitro* sont sans doute supérieurs aux effets *in vivo*.

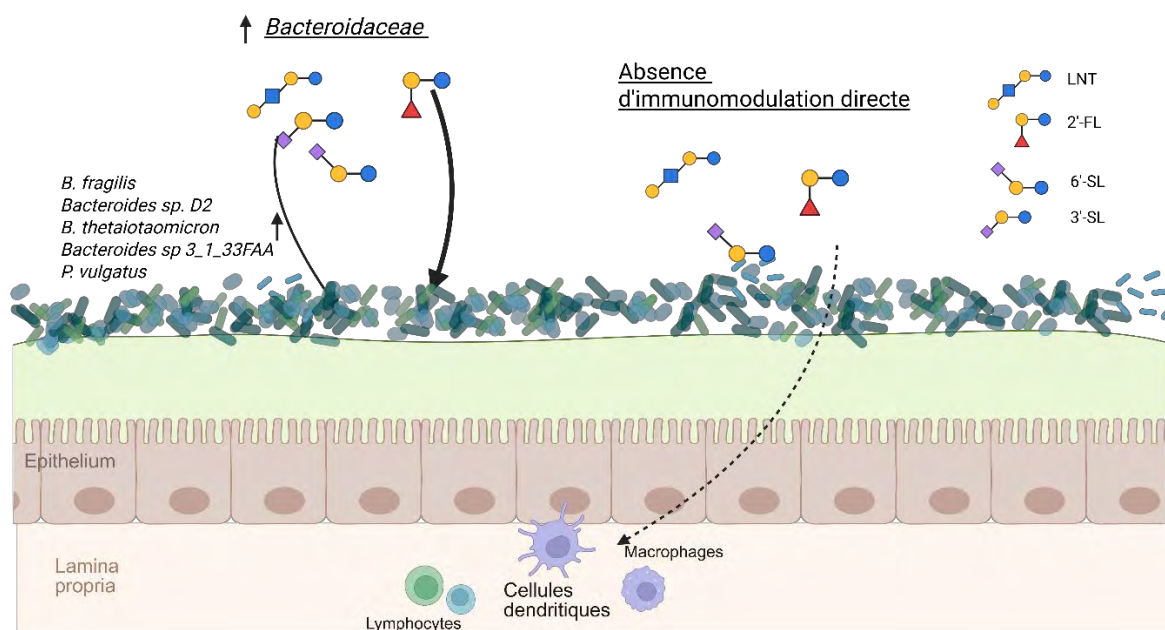


Figure 30 : Effets des oligosaccharides du lait LNT, 2'-FL, 6'-SL et 3'-SL sur l'immunité intestinale de notre modèle lapin. Les oligosaccharides du lait favorisent la croissance de *B. fragilis*, *Bacteroides sp. D2*, *B. thetaiotaomicron*, *Bacteroides sp 3\_1\_33FAA* et *P. vulgatus*, qui varie selon la structure du MO. La biomasse maximale est supérieure en présence de 2'-FL. Les MOs n'exercent pas d'effets immunomodulateurs directs. La largeur des flèches indique l'importance de l'effet. LNT : lacto-N-tetraose, 2'-FL : 2'-fucosyllactose, 6'-SL : 6'-sialyllactose, 3'-SL : 3'-sialyllactose. Figure créée avec Biorender.

Le développement d'un modèle d'étude des cellules mononucléées de la *lamina propria* caecale du lapin nous a permis de tester l'effet des MOs dans un contexte au plus proche des conditions intestinales. Nos résultats suggèrent que les MOs ont un effet immunomodulateur limité sur les cellules immunitaires de la *lamina propria*. L'absence de modulation de gènes appartenant à une même voie, et la faible ampleur des variations d'expression génique plaident en faveur d'un effet faible ou indirect des MOs, potentiellement médié par d'autres acteurs tels que le microbiote.

## V. Impact des oligosaccharides du lait sur la mise en place de l'holobionte

L'holobionte consiste à s'intéresser à l'hôte animal et aux microorganismes qui l'habitent comme une entité unique, au sein de laquelle des interactions directes ou indirectes s'établissent (Zilber-Rosenberg and Rosenberg, 2008). Ces microorganismes participent à l'éducation et à la régulation du système immunitaire (Kau et al., 2011). Cependant, la composition du microbiote est variable et dynamique au cours des premiers jours de vie. Plusieurs facteurs environnementaux peuvent l'influencer, tels que le pH intestinal, le taux d'oxygène intestinal ou encore le type de lait ingéré (Mackie et al., 1999; Azad et al., 2013; Gan et al., 2018).

### A. Les oligosaccharides du lait comme modulateurs précoces du microbiote intestinal

Nos résultats démontrent que certaines souches de *Bacteroides* isolées chez le lapereau et le porcelet sont capables de métaboliser spécifiquement des MOs présents dans le lait, suggérant un rôle dans la sélection bactérienne durant les premières phases de vie.

#### 1. Les oligosaccharides du lait structurent l'holobionte intestinal

Plusieurs bactéries, dont la croissance est favorisée en présence de MOs dans notre étude, ont démontré, dans la littérature, des effets protecteurs à l'échelle de l'hôte, tant en termes de renforcement de la barrière intestinale que de modulation immunitaire. Certaines bactéries, telles que les *Bifidobacterium*, auraient développé dans leur génome des locus spécifiques dédiés aux MOs, tandis que d'autres, les *Bacteroides*, utiliseraient les locus dédiés à la consommation du mucus (Marcobal et al., 2011). Ainsi, les MOs favorisent la prévalence des *Bacteroides* dans l'intestin, bactéries également capables de dégrader les mucines qui pourraient donc entrer en compétition avec les pathogènes qui colonisent la mucine pour envahir l'intestin. *B. thetaiotaomicron* est un symbionte, bien caractérisé chez l'humain. Il favorise la réparation de l'épithélium endommagé en stimulant l'expression de protéines de l'hôte, telles que CRP-ductin et Sprr2a, qui participent respectivement à la régénération tissulaire et à la fonction de barrière (Hooper et al., 2001). Sa capacité à se fixer au mucus intestinal via des protéines de liaison aux glucides, colonisant de fait l'intestin à la place de potentiels pathogènes (Bäckhed et al., 2005), combinée à ses fonctions anti-inflammatoires via l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B (Kelly et al., 2004), en ferait un acteur clé de l'homéostasie intestinale. Chez des porcelets atteints de diarrhées, l'administration de *B. thetaiotaomicron* a permis de réduire les réponses immunitaires pro-inflammatoires, d'augmenter les profils anti-inflammatoires et de favoriser la présence de familles bactériennes reconnues pour leurs effets bénéfiques, telles que les *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae*, dans le colon. De plus, dans un modèle de lignées cellulaires humaines Caco-2, les produits issus du métabolisme du tryptophane de *B. thetaiotaomicron* ont renforcé les jonctions serrées et la production de mucines tout en réduisant l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et TGF- $\beta$ , soulignant son rôle dans le maintien de l'intégrité épithéliale (Luo et al., 2025). De plus, *B. thetaiotaomicron* stimulerait la production du peptide antimicrobien Ang4 par les cellules de Paneth (Hooper et al., 2003), tandis que *P. vulgatus* produirait la protéine antibactérienne BcpT (Evans et al., 2022).

Bien que *P. vulgatus* ait été associée à une réduction de la colite chez la souris (Liu et al., 2022), elle peut se révéler délétère dans certains contextes, en particulier via la production de protéases augmentant la perméabilité intestinale (Mills et al., 2022), ce qui souligne l'importance de l'environnement intestinal dans l'interprétation des effets bactériens. *B. fragilis* illustre également cette dualité. Son polysaccharide A est reconnu pour induire la production d'IL-10, orienter les réponses immunitaires vers un profil Th1 et participer à la maturation du système immunitaire chez des souris axéniques (Mazmanian et al., 2005). Toutefois, certaines souches de *B. fragilis* entérotoxigéniques peuvent être des pathogènes opportunistes, sécrétant une toxine à l'origine de diarrhées inflammatoires (Valguarnera and Wardenburg, 2020). Chez le lapin, une probable association entre la présence de *B. fragilis* dans le caecum et l'entéropathie épizootique du lapin (ERE) a été rapportée dans un contexte de régime pauvre en fibres (Jin et al., 2018), suggérant que la nutrition, la composition du microbiote et la souche bactérienne conditionnent l'effet bénéfique ou délétère de certaines espèces.

## 2. Sélection de souches bactériennes via les produits de dégradation des oligosaccharides du lait

### i. Monosaccharides libérés par l'hydrolyse des MOs

Dans notre étude, la croissance des *Bacteroides* en présence des MOs a conduit à la libération de monosaccharides entrant dans la composition des MOs (III.B.4.i, Figure 31). Ces sucres simples peuvent servir de substrats à d'autres bactéries du microbiote qui ne sont pas capables de croître directement avec les MOs, suggérant également un effet indirect des MOs sur la modulation du microbiote. Plusieurs souches de *Lactobacillus* sont ainsi capables de croître en présence de glucose, galactose, lactose ou encore GlcNAc. Toutefois, la capacité à utiliser le fucose ou l'acide sialique reste restreinte, seules certaines souches de *L. rhamnosus* peuvent consommer du fucose, et une seule souche de *L. plantarum* a montré une croissance en présence d'acide sialique (Thongaram et al., 2017; Salli et al., 2021). De plus, *L. casei* ne croit pas en présence de LNT mais peut utiliser le lacto-N-biose (Bidart et al., 2014), un disaccharide dérivé des MOs, également utilisé par certaines espèces de *Bifidobacterium* (Xie et al., 2023). Dans une étude récente, Hashimoto et al. (2025) ont prédit le cluster de gènes d'utilisation de l'acide sialique (Nan cluster) chez le porc, à partir des analyses des séquences de l'ADNr 16S du microbiote fécal de porcelets. La fréquence de détection de ce cluster était significativement plus élevée avant le sevrage (21 jours), ce qui suggère qu'au cours de l'allaitement, le lait porcin riche en 3'-SL est une source d'énergie importante pour les bactéries présentes. Aucune *Lactobacillus* de leur étude ne croit en présence de 6'-SL et 3'-SL mais *L. salivarius*, également présente dans nos isollements de fèces de porcelets, croit en présence de NeuAc. Les auteurs ont également démontré la croissance de *L. salivarius* en coculture avec *B. thetaiotaomicron*, en présence de 3'-SL, cette dernière libérant le NeuAc, ainsi accessible pour *L. salivarius* (Hashimoto et al., 2025). Les monosaccharides libérés peuvent également être utilisés par d'autres bactéries commensales telles que les *Ruminococcaceae* ou d'autres espèces de *Bacteroides*, ce qui pourrait soutenir leur croissance au détriment de certains pathogènes (Pham et al., 2014).

Cependant, certains pathogènes opportunistes peuvent également tirer profit de ces substrats simples. Ainsi, plusieurs souches de *Salmonelle enterica* et de *Clostridium difficile* sont capables d'utiliser le fucose ou l'acide sialique pour leur croissance et la colonisation intestinale (Ng et al., 2013). Des études de co-culture ont montré que *P. vulgatus* peut libérer le fucose de la mucine, ce qui bénéficie à *Campilobacter jejuni*, dépourvue de la fucosidase pour libérer le fucose (Garber et al., 2020). Un mécanisme similaire a été observé avec le fucose libéré par *B. fragilis* (Luijckx et al., 2020). De plus, *B. thetaiotaomicron* peut cliver les acides sialiques grâce à ses sialidases, mais elle ne possède pas les gènes permettant de métaboliser ce monosaccharide, le rendant disponible pour des pathogènes comme *Salmonella typhimurium* et *Clostridium difficile* (Ng et al., 2013).

Parallèlement, les MOs possèdent des propriétés antimicrobiennes, agissant comme des leurres pour empêcher l'adhésion de pathogènes à l'épithélium (Simon et al., 1997; Weichert et al., 2013; Craft et al., 2019; Wang et al., 2020), une action non évaluée dans notre étude mais susceptible de contribuer à la modulation du microbiote. Ainsi, bien que les MOs puissent favoriser la croissance de bactéries bénéfiques et éliminer certains pathogènes, leur hydrolyse pourrait également favoriser certains pathogènes en mettant à disposition des substrats qu'ils peuvent exploiter. Cette dualité des effets des MOs, dépendante du contexte microbien, souligne l'importance de les étudier dans des conditions aussi proches que possible de la physiologie intestinale, intégrant les dynamiques communautaires microbiennes.

## ii. Produits de la métabolisation des MOs

La métabolisation des MOs génère une diversité de métabolites intermédiaires (Figure 31), qui ne représentent pas nécessairement les produits terminaux observés *in vivo*. En effet, dans l'intestin, ces composés peuvent être réutilisés par d'autres espèces bactériennes dans le cadre de réseaux de syntrophie, soulignant ainsi leur rôle central dans les interactions métaboliques qui structurent le microbiote. Bien que nous n'ayons pas évalué directement l'impact de ces métabolites sur la composition du microbiote, certaines études ont démontré leur implication dans les échanges entre espèces. Par exemple, le 1,2-propanediol qui est produit en abondance après la métabolisation du 2'-FL dans nos études, peut être utilisé par des bactéries telles que *Eubacterium hallii* ou *Limosilactobacillus reuteri* pour la production de propionate (Schwab et al., 2017; Cheng et al., 2020a). Ces processus métaboliques croisés peuvent enrichir la diversité fonctionnelle du microbiote. Dans nos cultures en présence de MOs, nous avons également observé l'accumulation de métabolites tels que le fumarate et le succinate, en particulier par *B. fragilis*. A l'instar du 1,2-propanediol, ces composés sont généralement considérés comme des intermédiaires, susceptibles d'être métabolisés en AGCC par d'autres membres du microbiote (Reichardt et al., 2014; Louis and Flint, 2017; Zhang et al., 2021a). Leur détection en monoculture souligne la nécessité de replacer ces résultats dans un contexte intestinal. Ils pourraient, *in vivo*, alimenter les voies métaboliques d'autres bactéries, participant ainsi à la mise en place d'un réseau trophique complexe.

## B. Une action conjointe MOs-microbiote-système immunitaire dans la mise en place de l'holobionte

### 1. Potentielle action des monosaccharides libérés par hydrolyse des oligosaccharides du lait

Nous l'avons vu, les bactéries peuvent hydrolyser les MOs en relâchant dans la lumière intestinale les monosaccharides composant les MOs (Figure 31). Ces derniers pourraient également impacter la réponse immunitaire mucoale. Le fucose pourrait réduire l'inflammation, comme cela a été montré *in vivo* chez une souris dépourvue de la protéine Muc2, la rendant sujette à une perméabilité intestinale. Dans cette étude le fucose a permis de réduire l'expression des cytokines pro-inflammatoires tout en augmentant l'expression des gènes des lymphocytes T régulateurs (Feofanova et al., 2022). Cet effet anti-inflammatoire a également été démontré *in vitro*, sur des macrophages murins du sang périphérique (He et al., 2019). De même, l'acide N-acetyl neuraminique, libéré lors de la métabolisation des MOs sialylés, possède des effets anti-inflammatoires. Chez des rats, la supplémentation en NeuAc pendant 12 semaines a réduit la production des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- $\alpha$  (Yida et al., 2015). Enfin, la culture des lymphocytes T issus de patients atteints d'ulcères du colon avec le GlcNAc, a permis d'augmenter la N-glycosylation des récepteurs des lymphocytes T, régulant à la baisse la réponse pro-inflammatoire (Dias et al., 2018). Les lectines présentes sur les cellules immunitaires reconnaissent certains MOs mais peuvent aussi reconnaître certains monosaccharides ou disaccharides libérés des MOs, activant ensuite des voies de régulation immunitaire. Les lectines de type C, présentes sur les cellules dendritiques et les macrophages, peuvent reconnaître le fucose et le galactose tandis que les siglecs reconnaissent l'acide N-acetyl-neuraminique (van Kooyk and Rabinovich, 2008).

### 2. Les produits issus de la métabolisation des oligosaccharides du lait

#### i. Effets immunomodulateurs indirects des oligosaccharides du lait via les métabolites bactériens

Nos résultats montrent que les MOs ont un impact direct faible sur le système immunitaire mucoale du lapereau (Figure 30). En revanche, ils exercent un effet immunomodulateur indirect fort, via la production de certains métabolites bactériens générés après leur métabolisation, l'isobutyrate, l'isovalérate et le propionate. Ces trois métabolites ont significativement modulé l'expression de nombreux gènes immunitaires, aussi bien en conditions basales que stimulées, après 4 et 24 h de culture. L'isovalérate et le propionate, en particulier, pourraient induire une activation des cellules myéloïdes et favoriser leur recrutement, comme en témoigne la régulation positive de gènes tels que CCR5, CD86, CD80, CD69 ou ITGAM. Ces effets ont été amplifiés en présence de LPS, soulignant leur rôle potentiel dans le renforcement d'une réponse immunitaire. De plus, ces deux métabolites ont déclenché une réponse pro-inflammatoire, marquée par l'augmentation de l'expression de IL1B, TNF, IL6, S100A8/9 et PTGS2. De même, l'inflammation induite par la stimulation au LPS a été amplifiée par ces métabolites.

Toutefois, les effets observés sont dynamiques et dépendent du contexte de stimulation et du temps d'exposition. Par exemple, IL6 est initialement réprimée après 4 h de culture par

l'isovalerate et le propionate, avant d'être sur-exprimée à 24 h. En parallèle, des gènes associés à la résolution de l'inflammation comme IL10RA ou CST3 sont également induits, tandis que l'expression de certains récepteurs de reconnaissance (PRR) est réduite. Ces résultats suggèrent un effet double, oscillant entre activation et régulation, et indiquent que ces métabolites pourraient participer à une maturation progressive du système immunitaire intestinal mais aussi exacerber la réponse inflammatoire induite par le LPS, ce qui peut être délétère. L'isobutyrate présente des effets similaires, mais plus modérés, affectant un nombre plus restreint de gènes et avec une amplitude d'effet plus faible.

Dans l'ensemble, ces données suggèrent que les métabolites, issus de la métabolisation des MOs, jouent un rôle central dans l'immunomodulation. Ils sont capables de mimer ou d'amplifier certaines réponses pro-inflammatoires, essentielles à l'immunocompétence du jeune, tout en activant des voies de régulation susceptibles de limiter une inflammation excessive. Cette double action pourrait refléter une adaptation physiologique, favorisant la mise en place d'un système immunitaire fonctionnel. Il est même possible que cette réponse immunitaire évoque la « réaction au sevrage », décrite comme un phénomène transitoire durant lequel le microbiote déclenche une production accrue des cytokines pro-inflammatoires TNF et IFN, favorisant une maturation du système immunitaire (Al Nabhani et al., 2019). D'ailleurs, la diminution de l'expression d'IL4, IL13 et IL18, combinée à l'augmentation de l'expression d'IL6 et TNF induite par les métabolites, pourrait refléter un basculement vers un phénotype Th1, alors que le système immunitaire néonatal est généralement orienté vers un phénotype Th2 (Adkins, 2000). Ce potentiel à induire à la fois des lymphocytes T effecteurs et régulateurs a également été observé pour les AGCCs dans des modèles de lymphocytes T de la rate et des ganglions murins (Park et al., 2015). Cependant, une telle activation immunitaire n'est pas dénuée de risques, ces métabolites pourraient favoriser un emballement de la réponse inflammatoire, délétère pour les tissus et susceptible de compromettre l'homéostasie immunitaire.

#### ii. Portée physiologique des effets observés chez le lapereau

Dans notre protocole, les cellules immunitaires ont été exposées à 2 mmol.L<sup>-1</sup> de chaque métabolite. Cette concentration est à mettre en perspective avec les niveaux physiologiques observés chez le lapin. Chez le lapereau au moment du sevrage, la concentration de propionate dans le contenu caecal atteint environ 4 mmol.L<sup>-1</sup> (Gidenne et al., 2002), ce qui reste cohérent avec notre modèle. En revanche, les données concernant l'isobutyrate et l'isovalerate sont plus limitées. Chez des lapins âgés de 42 à 56 jours, la concentration combinée d'isovalerate, isobutyrate et valérate est d'environ 0.319 mmol.L<sup>-1</sup> (Laurent-Bennegadi et al., 2013). Chez le lapin adulte, l'isobutyrate atteint 0.1 mmol.L<sup>-1</sup> et l'isovalerate 0.3 mmol.L<sup>-1</sup> (Alvarenga et al., 2017). Pour exercer leurs effets sur les LPMCs, ces métabolites, présents dans la lumière caecale, doivent traverser la barrière épithéliale intestinale. Les AGCCs peuvent franchir l'épithélium par diffusion passive ou via des transporteurs spécifiques, mais la concentration atteignant le compartiment immunitaire reste inférieure à celle mesurée dans la lumière caecale (Parada Venegas et al., 2019). Ainsi, les effets observés dans notre modèle *in vitro* pourraient être surestimés par rapport aux effets physiologiques réels. Le microbiote est donc crucial pour l'éducation du système immunitaire mais une

réponse exagérée peut conduire à des effets délétères, il faut donc un équilibre entre stimulation et tolérance (Bui et al., 2025).

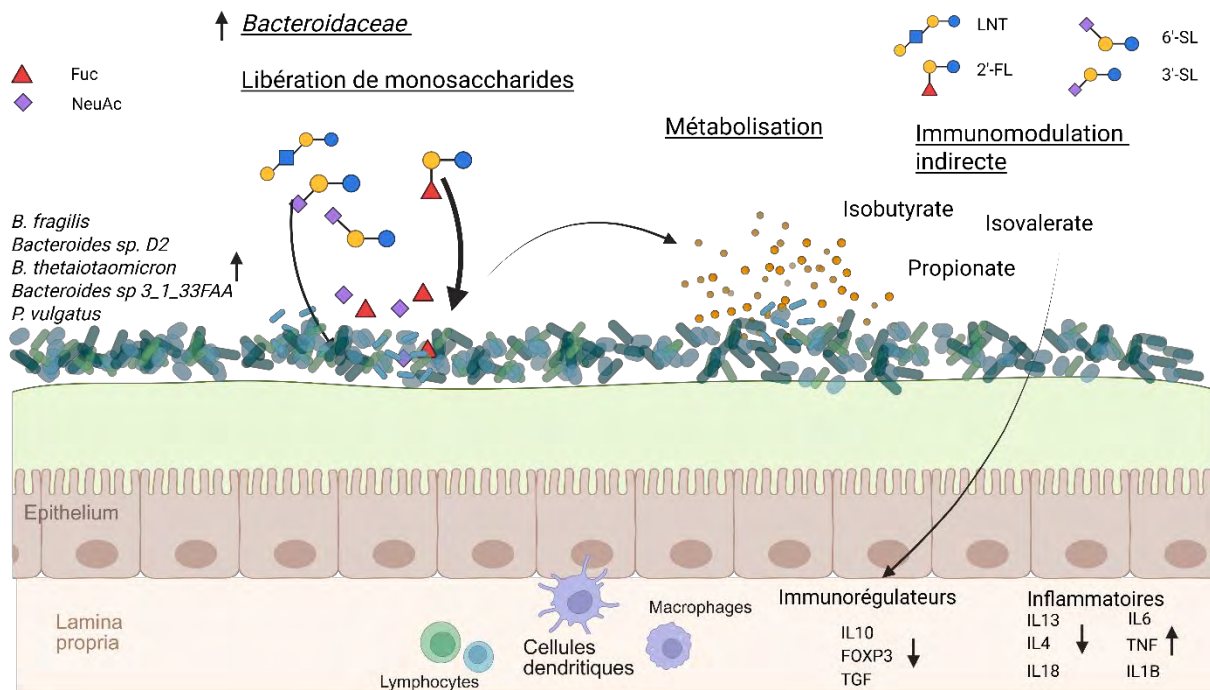


Figure 31 : Effets des oligosaccharides du lait LNT, 2'-FL, 6'-SL et 3'-SL sur l'holobionte de nos modèles porcs et lapins. Les oligosaccharides du lait favorisent la croissance de *B. fragilis*, *Bacteroides sp. D2*, *B. thetaiotaomicron*, *Bacteroides sp 3\_1\_33FAA* et *P. vulgatus*. La croissance varie selon la structure du MO, avec une biomasse maximale supérieure en présence du 2'-FL. Les métabolites produits par la métabolisation des MOs modulent la réponse immunitaire, favorisant une réponse inflammatoire. La largeur des flèches indique l'importance de l'effet. LNT : lacto-N-tetraose, 2'-FL : 2'-fucosyllactose, 6'-SL : 6'-sialyllactose, 3'-SL : 3'-sialyllactose. Figure créée avec Biorender.

Ces résultats soulignent que les MOs servent de substrat aux bactéries commensales et orientent également la composition et les fonctions du microbiote, favorisant l'émergence de communautés bactériennes coopératives avec l'hôte. Ces bactéries contribuent à la fortification de la barrière intestinale, à la compétition avec des pathogènes, à la production de métabolites protecteurs et à la modulation de la réponse immunitaire. Ces interactions témoignent de la coévolution étroite entre l'hôte et son microbiote, formant un holobionte fonctionnel. Ces interactions sont à replacer dans la symbiose, où l'hôte fournit des substrats spécifiques à certaines bactéries, qui en retour produisent des métaboliques bénéfiques pour l'hôte. Il faut toutefois noter que la réponse immunitaire à ces métabolites est ambivalente, et possiblement dépendante de la dose de ces derniers. L'étude de ces relations dans des modèles intégrant les conditions environnementales (alimentation, stress du sevrage, inflammation) permettra de mieux comprendre comment les MOs participent à la construction d'un holobionte résilient, équilibré et protecteur.

## VI. Perspectives

Les oligosaccharides du lait semblent moduler le microbiote et le système immunitaire des porcelets et lapereaux allaités. Cependant l'interprétation de ces données reste complexe, du fait de la diversité des mécanismes impliqués et des spécificités de chaque modèle expérimental. Ces résultats constituent un premier socle pour la poursuite de recherches

intégrées visant à caractériser plus finement les interactions entre MOs, microbiote, intégrité de l'épithélium et immunité, notamment à travers des approches multi-échelles et *in vivo*.

#### A. Caractérisation approfondie de nos modèles

Nos isollements bactériens nous ont permis d'identifier 240 isolats, obtenus à partir d'une sélection d'environ 10 colonies par milieu solide ensemencé. L'utilisation de techniques à haut débit comme la culturomique, qui combine une diversité de conditions de culture avec l'identification rapide des colonies par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Lagier et al., 2015; Clavel et al., 2017), pourrait nous permettre d'agrandir la collection de bactéries intestinales isolées chez nos espèces. Bien que cette approche nécessite un accès à des plateformes technologiques spécifiques et une importante phase d'optimisation, elle a déjà fait ses preuves chez le porc (Wylensek et al., 2020; Moote et al., 2021), et pourrait permettre l'isolement de nouvelles souches bactériennes du microbiote intestinal de nos espèces modèles.

Par ailleurs, nos résultats suggèrent que certaines bactéries commensales intestinales des porcelets et lapereaux sont capables de dégrader et métaboliser les MOs. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans cette capacité restent à élucider. Combiner une analyse fonctionnelle du génome des bactéries séquencées à une étude transcriptomique de l'expression différentielle des gènes codant pour les GHs lors de la croissance sur MOs serait particulièrement informatif. Cette stratégie a déjà été utilisée pour décrypter les voies métaboliques chez *B. thetaiotaomicron* (Marcobal et al., 2011; Sela et al., 2011, 2012) ou *Bifidobacterium longum* (Garrido et al., 2016). De plus, des approches de mutagenèse ciblée (knockout) permettraient de confirmer le rôle fonctionnel de ces enzymes (Kijner et al., 2024).

Sur le plan immunologique, une analyse en cytométrie de flux des cellules mononucléées de la *lamina propria* caecale du lapin en cours de culture, offrirait une caractérisation fine des populations immunitaires modulées par les MOs (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes). Il s'agit de prélever une fraction des cellules au cours du temps et d'analyser les marqueurs de surface, les marqueurs intracellulaires mais également la prolifération. Ainsi Xiao et al. (2018) ont observé une expansion des lymphocytes T régulateurs, Th1 et Th17 à partir de lymphocytes T naïfs de rates murines, exposés à des cellules dendritiques issues des PBMCs activées par les MOs. Cette méthode permet également de mesurer la production intracellulaire de cytokines (Robinson et al., 2023). Elle a été utilisée par Comstock et al. (2014) pour phénotyper les lymphocytes T du sang périphérique traités par un mélange de MOs humains, et par Jepsen et al. (2024) pour phénotyper les macrophages humains traités par trois MOs différents. En revanche, la disponibilité d'anticorps de cytométrie validés et adaptés, est nettement plus limitée chez le lapin, ce qui complique les études immunologiques par cytométrie de flux chez cette espèce (Davis and Hamilton, 2008).

#### B. Modèle *in vitro* intégrant le microbiote, l'épithélium et le système immunitaire

Nos travaux se sont volontairement concentrés sur des modèles séparés pour étudier de manière spécifique les effets des MOs sur le microbiote et sur les cellules immunitaires. Toutefois, des modèles plus complexes intégrant plusieurs composantes de la barrière intestinale permettraient d'approcher plus fidèlement les interactions croisées *in vivo*. Tout

d'abord, les modèles de coculture de consortia bactériens permettent d'étudier les effets indirects des MOs sur le microbiote. Ceci a déjà été réalisé dans plusieurs études (Cheng et al., 2020b; Nogacka et al., 2023; Dong et al., 2024), et nous permettrait de vérifier nos hypothèses quant à la croissance des *Lactobacillus* grâce aux monosaccharides libérés de l'hydrolyse des MOs, ou grâce aux métabolites issus de la consommation des MOs par les autres bactéries.

Les modèles de coculture associant cellules épithéliales et cellules immunitaires sont particulièrement intéressants pour mimer les conditions physiologiques. Des études ont, par exemple, utilisé des cellules Caco-2 (épithéliales) en coculture avec des macrophages THP-1, traités au LPS et IFN- $\gamma$ , et exposés ensuite aux MOs (Walsh et al., 2024). Ces travaux suggèrent que les MOs interagissent avec les cellules épithéliales qui, à leur tour, modulent la réponse immunitaire via des récepteurs spécifiques. Un autre modèle, utilisant des cellules HT-29 en coculture avec des PBMCs a montré que l'induction de lymphocytes Th1 par le 2'-FL ne se produisait qu'en présence des cellules épithéliales (Zuurveld et al., 2023), soulignant leur rôle central dans l'orchestration de la réponse immunitaire. Des médiateurs épithéliaux comme la Galectin 9, connue pour se lier aux MOs (Hirabayashi et al., 2002) et sécrétée par les cellules épithéliales, pourraient jouer un rôle clé dans cette modulation (de Kivit et al., 2013; Ayechu-Muruzabal et al., 2020). Dans notre modèle il serait possible de développer des cocultures de LPMCs avec des organoïdes intestinaux de lapin, déjà pratiqués au laboratoire. Ces outils ont déjà été utilisés chez la souris et l'humain pour explorer les interactions entre l'épithélium et les cellules immunitaires, en particulier les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les macrophages (Noel et al., 2017; Schreurs et al., 2021; Hammoudi et al., 2022; Recaldin et al., 2024).

Enfin, actuellement développée au sein de notre laboratoire, l'utilisation d'intestin sur puce (modèle miniaturisé d'intestin en structure 3D reposant sur un dispositif micro fluide pour reproduire les principales fonctions et structures de l'intestin vivant) s'avère particulièrement pertinent pour l'étude des MOs. Ces modèles reproduisent fidèlement la structure de l'épithélium intestinal (cellules polarisées, jonctions serrées), et peuvent intégrer plusieurs types cellulaires, tels des bactéries ainsi que des cellules immunitaires. Des modèles intégrant des lignées cellulaires épithéliales humaines Caco-2, des lignées cellulaires endothéliales humaines HUVEC et des macrophages et cellules dendritiques de PBMCs humains ont par exemple été développés. Ces modèles peuvent ensuite être colonisés par des bactéries pour étudier la réponse intestinale aux infections ou aux probiotiques (Maurer et al., 2019; Feile et al., 2024).

Enfin, bien que nous n'ayons étudié que quatre structures de MOs, leur diversité structurale est considérable. Il serait pertinent d'étendre l'analyse à des MOs plus complexes. En effet, dans l'étude de Walsh et al. (2024), les MOs isolés directement du lait humain ont montré une activité anti-inflammatoire supérieure à celle des MOs synthétiques, probablement en raison de la présence de MOs plus complexes dans le lait et de leurs effets synergétiques.

### C. Essais *in vivo*

Les modèles *in vitro*, aussi informatifs soient-ils, ne permettent pas de rendre compte de toute la complexité de l'écosystème intestinal. Les essais *in vivo* sont donc essentiels pour valider

les effets observés et étudier les interactions entre les MOs et la barrière intestinale dans sa globalité. Ils permettent notamment d'évaluer l'impact des MOs sur la composition microbienne (Wang et al., 2021a), la production de mucus (Wu et al., 2019b), la perméabilité intestinale (Boudry et al., 2017) ou encore la réponse immunitaire intestinale (Monaco et al., 2023). Ces études pourraient avoir lieu dans des conditions sanitaires bonnes ou dégradées, modulant la composition du microbiote et la stimulation du système immunitaire, afin d'évaluer l'impact des MOs dans des conditions contrastées. Cela a par exemple été réalisé dans des modèles de rats atteints d'entéocolite nécrosante (Zhang et al., 2021b), ou des porcelets infectés par un rotavirus (Li et al., 2014).

De plus, ces modèles permettraient de tester la faisabilité d'une supplémentation en MOs en élevage. Toutefois, chez les jeunes animaux, *in vivo*, le gavage peut générer un stress important, susceptible de limiter les bénéfices des MOs. Des études ont montré que le lapin est capable d'ingérer des aliments précocement (Paës et al., 2020), ce qui permettrait une supplémentation via l'aliment. A l'inverse, l'ingestion d'aliments solides reste faible chez les porcelets en période pré sevrage (Sulabo et al., 2010). Une alternative envisageable serait donc la dilution des MOs dans l'eau de boisson, méthode non invasive et potentiellement efficace pour une supplémentation précoce.

## Conclusion générale



L'objectif de cette thèse était de comprendre les liens fonctionnels entre la diversité de structure des oligosaccharides du lait (MOs), les capacités métaboliques des bactéries commensales du microbiote et la réponse immunitaire intestinale.

Dans une première phase nous avons exploré la diversité des oligosaccharides du lait en construisant un thésaurus des MOs, permettant d'harmoniser les dénominations utilisées dans la littérature scientifique. Nous avons également élaboré un corpus de textes annotés manuellement, utilisé pour le développement d'un algorithme d'extraction automatique des données issues de la littérature. Collectivement, ces travaux ont confirmé l'importante diversité structurale des MOs, ainsi que la multitude de facteurs influençant leur composition. Ils soulignent l'importance de mettre en place des bases de données centralisant et standardisant ces informations. Les outils développés dans ce cadre ouvrent la voie à un travail automatisé d'analyse textuelle et de collecte de données à grande échelle.

Nous avons ensuite étudié la capacité des bactéries intestinales de porcelets et de lapereaux à dégrader des MOs de différents types structuraux. Pour cela, nous avons mis en place des méthodes d'isolement et de culture de bactéries commensales en conditions anaérobies. Nos résultats montrent que plusieurs bactéries du genre *Bacteroides* sont capables de dégrader les MOs, mais que leur croissance et leur métabolisme dépendent fortement de la structure des MOs. Le séquençage du génome entier de ces bactéries a révélé la présence d'enzymes susceptibles d'hydrolyser les MOs. Cependant, certaines souches ne se développent pas, malgré la présence de ces enzymes, suggérant que des mécanismes supplémentaires (régulation, transporteurs ...) restent à élucider.

Sur cette base, nous avons analysé les effets directs et indirects des MOs sur les cellules mononuclées de la *lamina propria* caecale (LPMCs) des lapereaux. A cette fin, nous avons développé une méthode d'isolement, de culture et de stimulation de ces cellules, outil pertinent pour évaluer l'impact immunitaire de composés nutritionnels. Les MOs testés individuellement n'ont pas montré d'effets immunomodulateurs directs forts. En revanche, les métabolites issus de leur métabolisation par les bactéries intestinales ont induit une modulation marquée de la réponse immunitaire. En particulier, l'isovalerate et le propionate ont augmenté l'expression de marqueurs pro-inflammatoires, aussi bien en conditions basales qu'inflammatoires, et ont semblé orienter les lymphocytes T vers un phénotype de type Th1.

Finalement, nos travaux suggèrent que les MOs modulent la composition du microbiote intestinal chez le porcelet et le lapereau, de manière structure-dépendante. Cette modulation microbienne pourrait induire des répercussions sur la réponse immunitaire intestinale chez le lapereau. Ces résultats confortent les données de la littérature suggérant une spécificité fonctionnelle des MOs liée à leur structure. Au-delà de ces résultats, cette thèse a permis de développer des outils expérimentaux nouveaux pour l'étude du microbiote et de l'immunité intestinale chez les jeunes animaux d'élevage. L'enrichissement de l'alimentation pré-sevrage en MOs constitue une piste prometteuse pour favoriser la construction du microbiote et de l'immunité, et donc de l'holobionte. Ce concept mérite désormais d'être exploré plus en profondeur à l'aide de modèles *in vitro* plus complexes et d'essais *in vivo*, afin d'évaluer la faisabilité et les bénéfices d'une telle stratégie en élevage.



## Références bibliographiques



- Abdullah, M. H. A., Aziz, N., Abdulkadir, S. J., Hussain, K., Alhussian, H., and Talpur, N. (2024). A comprehensive review of existing corpora and methods for creating annotated corpora for event extraction tasks. *Journal of Data and Information Science* 9, 196–238. doi: 10.2478/jdis-2024-0029
- Abou Assale, T., Kuenzel, T., Schink, T., Shahraz, A., Neumann, H., and Klaus, C. (2023). 6'-sialyllactose ameliorates the ototoxic effects of the aminoglycoside antibiotic neomycin in susceptible mice. *Front Immunol* 14, 1264060. doi: 10.3389/fimmu.2023.1264060
- Abraham, C., and Cho, J. H. (2009). Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med* 361, 2066–2078. doi: 10.1056/NEJMra0804647
- Ackerman, D. L., Doster, R. S., Weitkamp, J.-H., Aronoff, D. M., Gaddy, J. A., and Townsend, S. D. (2017). Human Milk Oligosaccharides Exhibit Antimicrobial and Antibiofilm Properties against Group B Streptococcus. *ACS Infect Dis* 3, 595–605. doi: 10.1021/acsinfecdis.7b00064
- Adkins, B. (2000). Development of Neonatal Th1/Th2 Function. *International Reviews of Immunology* 19, 157–171. doi: 10.3109/08830180009088503
- Ai, W., Li, H., Song, N., Li, L., and Chen, H. (2013). Optimal Method to Stimulate Cytokine Production and Its Use in Immunotoxicity Assessment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10, 3834–3842. doi: 10.3390/ijerph10093834
- Akazawa, H., Tsujikawa, Y., Fukuda, I., Suzuki, Y., Choi, M., Katayama, T., et al. (2021). Isolation and identification of milk oligosaccharide-degrading bacteria from the intestinal contents of suckling rats. *BIOSCIENCE OF MICROBIOTA FOOD AND HEALTH* 40, 27–32. doi: 10.12938/bmfh.2020-024
- Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4, 499–511. doi: 10.1038/nri1391
- Al Nabhani, Z., Dulauroy, S., Marques, R., Cousu, C., Al Bounny, S., Déjardin, F., et al. (2019). A Weaning Reaction to Microbiota Is Required for Resistance to Immunopathologies in the Adult. *Immunity* 50, 1276–1288.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2019.02.014
- Alberge, J., Mussard, E., Al-Ayoubi, C., Lencina, C., Marraud, C., Cauquil, L., et al. (2024). Butyrate reduces epithelial barrier dysfunction induced by the foodborne mycotoxin deoxynivalenol in cell monolayers derived from pig jejunum organoids. *Gut Microbes* 16, 2430424. doi: 10.1080/19490976.2024.2430424
- Albrecht, S., Lane, J. A., Mariño, K., Al Busadah, K. A., Carrington, S. D., Hickey, R. M., et al. (2014). A comparative study of free oligosaccharides in the milk of domestic animals. *British Journal of Nutrition* 111, 1313–1328. doi: 10.1017/S0007114513003772
- Aldredge, D. L., Geronimo, M. R., Hua, S., Nwosu, C. C., Lebrilla, C. B., and Barile, D. (2013). Annotation and structural elucidation of bovine milk oligosaccharides and determination of novel fucosylated structures. *Glycobiology* 23, 664–676. doi: 10.1093/glycob/cwt007

- Alvarenga, I. C., Aldrich, C. G., and Kohles, M. (2017). The Effect of Feed Form on Diet Digestibility and Cecal Parameters in Rabbits. *Animals* 7, 95. doi: 10.3390/ani7120095
- Amano, J., Osanai, M., Orita, T., Sugahara, D., and Osumi, K. (2009). Structural determination by negative-ion MALDI-QIT-TOFMSn after pyrene derivatization of variously fucosylated oligosaccharides with branched decaose cores from human milk. *Glycobiology* 19, 601–614. doi: 10.1093/glycob/cwp026
- Amiry, A. F., Kigata, T., and Shibata, H. (2019). Wall thickness and mucous cell distribution in the rabbit large intestine. *The Journal of Veterinary Medical Science* 81, 990–999. doi: 10.1292/jvms.19-0159
- Andrani, M., Borghetti, P., Ravanetti, F., Cavalli, V., Ferrari, L., De Angelis, E., et al. (2023). Acetate and propionate effects in response to LPS in a porcine intestinal co-culture model. *Porcine Health Management* 9, 23. doi: 10.1186/s40813-023-00316-y
- Anses (2024). Médicaments antimicrobiens chez l'animal - Surveillance des ventes et utilisations pour l'année 2023.
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeken, J., deRoos, P., et al. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 504, 451–455. doi: 10.1038/nature12726
- Arrazuria, R., Pérez, V., Molina, E., Juste, R. A., Khafipour, E., and Elguezabal, N. (2018). Diet induced changes in the microbiota and cell composition of rabbit gut associated lymphoid tissue (GALT). *Scientific Reports* 8, 14103. doi: 10.1038/s41598-018-32484-1
- Asakuma, S., Hatakeyama, E., Urashima, T., Yoshida, E., Katayama, T., Yamamoto, K., et al. (2011). Physiology of Consumption of Human Milk Oligosaccharides by Infant Gut-associated Bifidobacteria. *Journal of Biological Chemistry* 286, 34583–34592. doi: 10.1074/jbc.M111.248138
- Ashida, H., Miyake, A., Kiyohara, M., Wada, J., Yoshida, E., Kumagai, H., et al. (2009). Two distinct -L-fucosidases from *Bifidobacterium bifidum* are essential for the utilization of fucosylated milk oligosaccharides and glycoconjugates. *Glycobiology* 19, 1010–1017. doi: 10.1093/glycob/cwp082
- Ashley, N. T., Weil, Z. M., and Nelson, R. J. (2012). Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 43, 385–406. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-040212-092530
- Ashline, D., Yu, Y., Lasanajak, Y., Song, X., Hu, L., Ramani, S., et al. (2014). Structural Characterization by Multistage Mass Spectrometry (MSn) of Human Milk Glycans Recognized by Human Rotaviruses. *Molecular & Cellular Proteomics* 13, 2961–2974. doi: 10.1074/mcp.M114.039925
- Ayechu-Muruzabal, V., Overbeek, S. A., Kostadinova, A. I., Stahl, B., Garssen, J., van't Land, B., et al. (2020). Exposure of Intestinal Epithelial Cells to 2'-Fucosyllactose and CpG Enhances Galectin Release and Instructs Dendritic Cells to Drive Th1 and Regulatory-Type Immune Development. *Biomolecules* 10, 784. doi: 10.3390/biom10050784

- Ayechu-Muruzabal, V., Poelmann, B., Berends, A. J., Kettelarij, N., Garssen, J., van't Land, B., et al. (2022). Human Milk Oligosaccharide 2'-Fucosyllactose Modulates Local Viral Immune Defense by Supporting the Regulatory Functions of Intestinal Epithelial and Immune Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 10958. doi: 10.3390/ijms231810958
- Ayechu-Muruzabal, V., van Stigt, A., Mank, M., Willemsen, L., Stahl, B., Garssen, J., et al. (2018). Diversity of Human Milk Oligosaccharides and Effects on Early Life Immune Development. *Frontiers in Pediatrics* 6. doi: 10.3389/fped.2018.00239
- Azad, M. B., Konya, T., Maughan, H., Guttman, D. S., Field, C. J., Chari, R. S., et al. (2013). Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *Canadian Medical Association Journal* 185, 385–394. doi: 10.1503/cmaj.121189
- Azad, M. B., Robertson, B., Atakora, F., Becker, A. B., Subbarao, P., Moraes, T. J., et al. (2018). Human Milk Oligosaccharide Concentrations Are Associated with Multiple Fixed and Modifiable Maternal Characteristics, Environmental Factors, and Feeding Practices. *The Journal of nutrition* 148, 1733–1742. doi: 10.1093/jn/nxy175
- Azagra-Boronat, I., Massot-Cladera, M., Mayneris-Perxachs, J., Knipping, K., van't Land, B., Tims, S., et al. (2019). Immunomodulatory and Prebiotic Effects of 2'-Fucosyllactose in Suckling Rats. *Frontiers in Immunology* 10, 1773. doi: 10.3389/fimmu.2019.01773
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., and Gordon, J. I. (2005). Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science* 307, 1915–1920. doi: 10.1126/science.1104816
- Bailey, M., Plunkett, F. J., Rothkötter, H.-J., Vega-Lopez, M. A., Haverson, K., and Stokes, C. R. (2001). Regulation of mucosal immune responses in effector sites. *Proceedings of the Nutrition Society* 60, 427–435. doi: 10.1079/PNS2001118
- Bajury, D. M., Nashri, S. M., King Jie Hung, P., and Sarbini, S. R. (2018). Evaluation of potential prebiotics: a review. *Food Reviews International* 34, 639–664. doi: 10.1080/87559129.2017.1373287
- Balogh, R., Jankovics, P., and Béni, S. (2015). Qualitative and quantitative analysis of N-acetyllactosamine and lacto-N-biose, the two major building blocks of human milk oligosaccharides in human milk samples by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a porous graphitic carbon column. *Journal of chromatography. A* 1422, 140–146. doi: 10.1016/j.chroma.2015.10.006
- Bandrick, M., Ariza-Nieto, C., Baidoo, S. K., and Molitor, T. W. (2014). Colostral antibody-mediated and cell-mediated immunity contributes to innate and antigen-specific immunity in piglets. *Developmental & Comparative Immunology* 43, 114–120. doi: 10.1016/j.dci.2013.11.005
- Bansil, R., and Turner, B. S. (2018). The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Advanced Drug Delivery Reviews* 124, 3–15. doi: 10.1016/j.addr.2017.09.023

- Barile, D., Marotta, M., Chu, C., Mehra, R., Grimm, R., Lebrilla, C. B., et al. (2010). Neutral and acidic oligosaccharides in Holstein-Friesian colostrum during the first 3 days of lactation measured by high performance liquid chromatography on a microfluidic chip and time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Dairy Science* 93, 3940–3949. doi: 10.3168/jds.2010-3156
- Barile, D., Tao, N., Lebrilla, C. B., Coisson, J.-D., Arlorio, M., and German, J. B. (2009). Permeate from cheese whey ultrafiltration is a source of milk oligosaccharides. *International Dairy Journal* 19, 524–530. doi: 10.1016/j.idairyj.2009.03.008
- Baumgartner, F., Seitz, L., Sprenger, G., and Albermann, C. (2013). Construction of *Escherichia coli* strains with chromosomally integrated expression cassettes for the synthesis of 2'-fucosyllactose. *Microbial Cell Factories* 12. doi: 10.1186/1475-2859-12-40
- Beaumont, M., Mussard, E., Barilly, C., Lencina, C., Gress, L., Panteaux, L., et al. (2021). Developmental Stage, Solid Food Introduction, and Suckling Cessation Differentially Influence the Comaturation of the Gut Microbiota and Intestinal Epithelium in Rabbits. *The Journal of Nutrition* 152, 723. doi: 10.1093/jn/nxab411
- Beaumont, M., Paës, C., Mussard, E., Knudsen, C., Cauquil, L., Aymard, P., et al. (2020). Gut microbiota derived metabolites contribute to intestinal barrier maturation at the suckling-to-weaning transition. *Gut Microbes* 11, 1268–1286. doi: 10.1080/19490976.2020.1747335
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., and Stryer, L. eds. (2015). *Biochemistry.*, 8. ed. New York, NY: W.H. Freeman/Macmillan.
- Berger, B., Porta, N., Foata, F., Grathwohl, D., Delley, M., Moine, D., et al. (2020). Linking Human Milk Oligosaccharides, Infant Fecal Community Types, and Later Risk To Require Antibiotics. *mBio* 11. doi: 10.1128/mBio.03196-19
- Bhat, Z., and Bhat, H. (2011). Milk and Dairy Products as Functional Foods: A Review. *International Journal of Dairy Science* 6, 1–12. doi: 10.3923/ijds.2011.1.12
- Bian, G., Ma, S., Zhu, Z., Su, Y., Zoetendal, E. G., Mackie, R., et al. (2016). Age, introduction of solid feed and weaning are more important determinants of gut bacterial succession in piglets than breed and nursing mother as revealed by a reciprocal cross-fostering model. *Environmental Microbiology* 18, 1566–1577. doi: 10.1111/1462-2920.13272
- Bianchi, A. T. J., Zwart, R. J., Jeurissen, S. H. M., and Moonen-Leusen, H. W. M. (1992). Development of the B- and T-cell compartments in porcine lymphoid organs from birth to adult life: an immunohistological approach. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 33, 201–221. doi: 10.1016/0165-2427(92)90182-P
- Bidart, G. N., Rodríguez-Díaz, J., Monedero, V., and Yebra, M. J. (2014). A unique gene cluster for the utilization of the mucosal and human milk-associated glycans galacto- N -biose and lacto- N -biose in *Lactobacillus casei*: Galacto- and lacto- N -biose utilization in *Lactobacillus*. *Molecular Microbiology* 93, 521–538. doi: 10.1111/mmi.12678
- Biddulph, C., Holmes, M., Tran, T. D., Kuballa, A., Davies, P. S. W., Koorts, P., et al. (2023). Associations between Maternal Nutrition and the Concentrations of Human Milk

- Oligosaccharides in a Cohort of Healthy Australian Lactating Women. *Nutrients* 15, 2093. doi: 10.3390/nu15092093
- Bivolarski, B. L., and Vachkova, E. G. (2014). Morphological and functional events associated to weaning in rabbits. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 98, 9–18. doi: 10.1111/jpn.12058
- Blank, D., Dotz, V., Geyer, R., and Kunz, C. (2012). Human Milk Oligosaccharides and Lewis Blood Group: Individual High-Throughput Sample Profiling to Enhance Conclusions From Functional Studies. *Advances in Nutrition* 3, 440S-449S. doi: 10.3945/an.111.001446
- Blaxter, K. L. (1961). "Lactation and growth of the young," in *Milk: the mammary gland and its secretion*, 305–361.
- Bode, L. (2012). Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* 22, 1147–1162. doi: 10.1093/glycob/cws074
- Bode, L. (2020). Human Milk Oligosaccharides: Structure and Functions., eds. P. Ogra, W. Walker, and B. Lonnerdal, 115–123. doi: 10.1159/000505339
- Bode, L., Contractor, N., Barile, D., Pohl, N., Prudden, A. R., Boons, G.-J., et al. (2016). Overcoming the limited availability of human milk oligosaccharides: challenges and opportunities for research and application. *Nutrition reviews* 74, 635–644. doi: 10.1093/nutrit/nuw025
- Bode, L., and Jantscher-Krenn, E. (2012). Structure-Function Relationships of Human Milk Oligosaccharides. *Advances in Nutrition* 3, 383S-391S. doi: 10.3945/an.111.001404
- Bode, L., Kunz, C., Muhly-Reinholz, M., Mayer, K., Seeger, W., and Rudloff, S. (2004). Inhibition of monocyte, lymphocyte, and neutrophil adhesion to endothelial cells by human milk oligosaccharides. *Thrombosis and Haemostasis* 92, 1402–1410. doi: 10.1160/TH04-01-0055
- Boll, E. J., Lopez, D. V., Terne, M., Hessing, S., Parschat, K., and Jensen, S. R. (2024). Human milk oligosaccharides differentially support gut barrier integrity and enhance Th1 and Th17 cell effector responses in vitro. *Frontiers in Immunology* 15, 1359499.
- Borewicz, K., Gu, F., Saccenti, E., Arts, I., Penders, J., Thijs, C., et al. (2019). Correlating Infant Fecal Microbiota Composition and Human Milk Oligosaccharide Consumption by Microbiota of 1-Month-Old Breastfed Infants. *Molecular Nutrition & Food Research* 63. doi: 10.1002/mnfr.201801214
- Borewicz, K., Gu, F., Saccenti, E., Hechler, C., Beijers, R., de Weerth, C., et al. (2020). The association between breastmilk oligosaccharides and faecal microbiota in healthy breastfed infants at two, six, and twelve weeks of age. *Scientific Reports* 10. doi: 10.1038/s41598-020-61024-z
- Borghesi, J., Mario, L. C., Rodrigues, M. N., Favaron, P. O., and Miglino, M. A. (2014). Immunoglobulin Transport during Gestation in Domestic Animals and Humans—A Review. *Open Journal of Animal Sciences* 04, 323–336. doi: 10.4236/ojas.2014.45041

- Bosheva, M., Tokodi, I., Krasnow, A., Pedersen, H. K., Lukjancenka, O., Eklund, A. C., et al. (2022). Infant Formula With a Specific Blend of Five Human Milk Oligosaccharides Drives the Gut Microbiota Development and Improves Gut Maturation Markers: A Randomized Controlled Trial. *Frontiers in Nutrition* 9, 920362. doi: 10.3389/fnut.2022.920362
- Boudry, G., Hamilton, M., Chichlowski, M., Wickramasinghe, S., Barile, D., Kalanetra, K., et al. (2017). Bovine milk oligosaccharides decrease gut permeability and improve inflammation and microbial dysbiosis in diet-induced obese mice. *Journal of Dairy Science* 100, 2471–2481. doi: 10.3168/jds.2016-11890
- Boudry, G., Jamin, A., Chatelais, L., Gras-Le Guen, C., Michel, C., and Le Huërou-Luron, I. (2013). Dietary Protein Excess during Neonatal Life Alters Colonic Microbiota and Mucosal Response to Inflammatory Mediators Later in Life in Female Pigs<sup>1, 2, 3</sup>. *The Journal of Nutrition* 143, 1225–1232. doi: 10.3945/jn.113.175828
- Boudry, G., Péron, V., Le Huërou-Luron, I., Lallès, J. P., and Sève, B. (2004). Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. *The Journal of Nutrition* 134, 2256–2262. doi: 10.1093/jn/134.9.2256
- Bowman, L. M., and Holt, P. G. (2001). Selective Enhancement of Systemic Th1 Immunity in Immunologically Immature Rats with an Orally Administered Bacterial Extract. *Infection and Immunity* 69, 3719–3727. doi: 10.1128/IAI.69.6.3719-3727.2001
- Brand-Miller, J. C., McVeagh, P., McNeil, Y., and Messer, M. (1998). Digestion of human milk oligosaccharides by healthy infants evaluated by the lactulose hydrogen breath test. *The Journal of Pediatrics* 133, 95–98. doi: 10.1016/S0022-3476(98)70185-4
- Brigham, C., Caughlan, R., Gallegos, R., Dallas, M. B., Godoy, V. G., and Malamy, M. H. (2009). Sialic Acid ( *N* -Acetyl Neuraminic Acid) Utilization by *Bacteroides fragilis* Requires a Novel *N* -Acetyl Mannosamine Epimerase. *Journal of Bacteriology* 191, 3629–3638. doi: 10.1128/JB.00811-08
- Brown, A. J., Goldsworthy, S. M., Barnes, A. A., Eilert, M. M., Tcheang, L., Daniels, D., et al. (2003). The Orphan G Protein-coupled Receptors GPR41 and GPR43 Are Activated by Propionate and Other Short Chain Carboxylic Acids\*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 11312–11319. doi: 10.1074/jbc.M211609200
- Bruntz, R., Dabrowski, U., Dabrowski, J., Ebersold, A., Peter-Katalinić, J., and Egge, H. (1988). Fucose-containing oligosaccharides from human milk from a donor of blood group O Le(a) nonsecretor. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 369, 257–273.
- Bui, T. N. Y., Paul, A., Guleria, S., O’Sullivan, J. M., and Toldi, G. (2025). Short-chain fatty acids— a key link between the gut microbiome and T-lymphocytes in neonates? *Pediatric Research*, 1–9. doi: 10.1038/s41390-025-04075-0
- Burke Schinkel, S. C., Barros, P. O., Berthoud, T., Byrareddy, S. N., McGuinty, M., Cameron, D. W., et al. (2024). Comparative analysis of human gut- and blood-derived mononuclear cells: contrasts in function and phenotype. *Frontiers in Immunology* 15, 1336480. doi: 10.3389/fimmu.2024.1336480

- Burkey, T. E., Skjolaas, K. A., and Minton, J. E. (2009). BOARD-INVITED REVIEW: Porcine mucosal immunity of the gastrointestinal tract1. *Journal of Animal Science* 87, 1493–1501. doi: 10.2527/jas.2008-1330
- Butler, J. E., Sun, J., Weber, P., Navarro, P., and Francis, D. (2000). Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets, III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues. *Immunology* 100, 119–130. doi: 10.1046/j.1365-2567.2000.00013.x
- Calatayud, M., Dezutter, O., Hernandez-Sanabria, E., Hidalgo-Martinez, S., Meysman, F. J. R., and Van De Wiele, T. (2019). Development of a host-microbiome model of the small intestine. *The FASEB Journal* 33, 3985–3996. doi: 10.1096/fj.201801414R
- Camilleri, M., Madsen, K., Spiller, R., Van Meerveld, B. G., and Verne, G. N. (2012). Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterology & Motility* 24, 503–512. doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01921.x
- Cao, S., Hou, L., Sun, L., Gao, J., Gao, K., Yang, X., et al. (2022). Intestinal morphology and immune profiles are altered in piglets by early-weaning. *International Immunopharmacology* 105, 108520. doi: 10.1016/j.intimp.2022.108520
- CAZy - GH20 (2025). *Carbohydrate Active Enzymes*. Available at: <https://www.cazy.org/GH20.html>
- Chang, P. V., Hao, L., Offermanns, S., and Medzhitov, R. (2014). The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 2247–2252. doi: 10.1073/pnas.1322269111
- Chanput, W., Peters, V., and Wichers, H. (2015). “THP-1 and U937 Cells,” in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, eds. K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, et al. (Cham: Springer International Publishing), 147–159. doi: 10.1007/978-3-319-16104-4\_14
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125, S3–S23. doi: 10.1016/j.jaci.2009.12.980
- Chatziioannou, A., Benjamins, E., Pellis, L., Haandrikman, A., Dijkhuizen, L., and van Leeuwen, S. (2021). Extraction and Quantitative Analysis of Goat Milk Oligosaccharides: Composition, Variation, Associations, and 2'-FL Variability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69, 7851–7862. doi: 10.1021/acs.jafc.1c00499
- Chen, L., Xu, Y., Chen, X., Fang, C., Zhao, L., and Chen, F. (2017). The Maturing Development of Gut Microbiota in Commercial Piglets during the Weaning Transition. *Frontiers in Microbiology* 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.01688
- Chen, X. (2015). “Human Milk Oligosaccharides (HMOS),” in *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, (Elsevier), 113–190. doi: 10.1016/bs.accb.2015.08.002
- Cheng, C. C., Duar, R. M., Lin, X., Perez-Munoz, M. E., Tollenaar, S., Oh, J.-H., et al. (2020a). Ecological Importance of Cross-Feeding of the Intermediate Metabolite 1,2-

Propanediol between Bacterial Gut Symbionts. *Applied and Environmental Microbiology* 86, e00190-20. doi: 10.1128/AEM.00190-20

- Cheng, L., Kiewiet, M. B. G., Groeneveld, A., Nauta, A., and de Vos, P. (2019). Human milk oligosaccharides and its acid hydrolysate LNT2 show immunomodulatory effects via TLRs in a dose and structure-dependent way. *Journal of Functional Foods* 59, 174–184. doi: 10.1016/j.jff.2019.05.023
- Cheng, L., Kiewiet, M., Logtenberg, M., Groeneveld, A., Nauta, A., Schols, H., et al. (2020b). Effects of Different Human Milk Oligosaccharides on Growth of Bifidobacteria in Monoculture and Co-culture With *Faecalibacterium prausnitzii*. *Frontiers in Microbiology* 11. doi: 10.3389/fmicb.2020.569700
- Cheng, L., Kong, C., Walvoort, M. T. C., Faas, M. M., and de Vos, P. (2020c). Human Milk Oligosaccharides Differently Modulate Goblet Cells Under Homeostatic, Proinflammatory Conditions and ER Stress. *Molecular Nutrition & Food Research* 64, 1900976. doi: 10.1002/mnfr.201900976
- Cheng, L., Xu, Q., Yang, K., He, J., Chen, D., Du, Y., et al. (2016). Annotation of porcine milk oligosaccharides throughout lactation by hydrophilic interaction chromatography coupled with quadruple time of flight tandem mass spectrometry. *Electrophoresis* 37, 1525–1531. doi: 10.1002/elps.201500471
- Chia, L. W., Mank, M., Blijenberg, B., Aalvink, S., Bongers, R. S., Stahl, B., et al. (2020). *Bacteroides thetaiotaomicron* Fosters the Growth of Butyrate-Producing *Anaerostipes caccae* in the Presence of Lactose and Total Human Milk Carbohydrates. *Microorganisms* 8, 1513. doi: 10.3390/microorganisms8101513
- Choo, J. M., Leong, L. E., and Rogers, G. B. (2015). Sample storage conditions significantly influence faecal microbiome profiles. *Scientific Reports* 5, 16350. doi: 10.1038/srep16350
- Choudhury, R., Middelkoop, A., Boekhorst, J., Gerrits, W. J. J., Kemp, B., Bolhuis, J. E., et al. (2021). Early life feeding accelerates gut microbiome maturation and suppresses acute post-weaning stress in piglets. *Environmental Microbiology* 23, 7201–7213. doi: 10.1111/1462-2920.15791
- Chouraqui, J. (2021). Does the contribution of human milk oligosaccharides to the beneficial effects of breast milk allow us to hope for an improvement in infant formulas? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 61, 1503–1514. doi: 10.1080/10408398.2020.1761772
- Ciarlo, E., Heinonen, T., Herderschee, J., Fenwick, C., Mombelli, M., Le Roy, D., et al. (2016). Impact of the microbial derived short chain fatty acid propionate on host susceptibility to bacterial and fungal infections in vivo. *Scientific Reports* 6, 37944. doi: 10.1038/srep37944
- Ciesielska, A., Matyjek, M., and Kwiatkowska, K. (2021). TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* 78, 1233–1261. doi: 10.1007/s00018-020-03656-y

- Claps, S., Di Napoli, M., Caputo, A., Rufrano, D., Sepe, L., and Di Trana, A. (2016). Factor affecting the 3 ' sialyllactose, 6 ' sialyllactose and disialyllactose content in caprine colostrum and milk: Breed and parity. *Small ruminant research* 134, 8–13. doi: 10.1016/j.smallrumres.2015.11.002
- Claps, S., Di Napoli, M., Sepe, L., Caputo, A., Rufrano, D., Di Trana, A., et al. (2014). Sialyloligosaccharides content in colostrum and milk of two goat breeds. *Small ruminant research* 121, 116–119. doi: 10.1016/j.smallrumres.2013.12.024
- Clavel, T., Lagkouvardos, I., and Stecher, B. (2017). From complex gut communities to minimal microbiomes via cultivation. *Current Opinion in Microbiology* 38, 148–155. doi: 10.1016/j.mib.2017.05.013
- Combes, S., Gidenne, T., Cauquil, L., Bouchez, O., and Fortun-Lamothe, L. (2014). Coprophagous behavior of rabbit pups affects implantation of cecal microbiota and health status1. *Journal of Animal Science* 92, 652–665. doi: 10.2527/jas.2013-6394
- Combes, S., Michelland, R. J., Monteils, V., Cauquil, L., Soulié, V., Tran, N. U., et al. (2011). Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity: Postnatal development of rabbit caecal microbiota. *FEMS Microbiology Ecology* 77, 680–689. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01148.x
- Comstock, S. S., Wang, M., Hester, S. N., Li, M., and Donovan, S. M. (2014). Select human milk oligosaccharides directly modulate peripheral blood mononuclear cells isolated from 10-d-old pigs. *British Journal of Nutrition* 111, 819–828. doi: 10.1017/S0007114513003267
- Coombes, J. L., and Powrie, F. (2008). Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nature Reviews Immunology* 8, 435–446. doi: 10.1038/nri2335
- Coppa, G., Pierani, P., Zampini, L., Carloni, I., Carlucci, A., and Gabrielli, O. (1999). Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. *Acta Paediatrica* 88, 89–94. doi: 10.1111/j.1651-2227.1999.tb01307.x
- Craft, K. M., Thomas, H. C., and Townsend, S. D. (2019). Sialylated variants of lacto-N-tetraose exhibit antimicrobial activity against Group B Streptococcus. *Organic & biomolecular chemistry* 17, 1893–1900. doi: 10.1039/c8ob02080a
- Crocker, P. R., Paulson, J. C., and Varki, A. (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nature Reviews Immunology* 7, 255–266. doi: 10.1038/nri2056
- Curtis, J., and Bourne, F. J. (1971). Immunoglobulin quantitation in sow serum, colostrum and milk and the serum of young pigs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 236, 319–332. doi: 10.1016/0005-2795(71)90181-4
- Dahlenborg, M., Borch, E., and Rådström, P. (2001). Development of a Combined Selection and Enrichment PCR Procedure for Clostridium botulinum Types B, E, and F and Its Use To Determine Prevalence in Fecal Samples from Slaughtered Pigs. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4781–4788. doi: 10.1128/AEM.67.10.4781-4788.2001
- Daniels, V. C., Monaco, M. H., Wang, M., Hirvonen, J., Jensen, H. M., Ouwehand, A. C., et al. (2022). Evaluation of 2'-Fucosyllactose and Bifidobacterium longum Subspecies

- infantis on Growth, Organ Weights, and Intestinal Development of Piglets. *Nutrients* 14, 199. doi: 10.3390/nu14010199
- Davies, R. R., and Rees Davies, J. A. E. (2003). Rabbit gastrointestinal physiology. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 6, 139–153. doi: 10.1016/S1094-9194(02)00024-5
- Davis, J. C. C., Lewis, Z. T., Krishnan, S., Bernstein, R. M., Moore, S. E., Prentice, A. M., et al. (2017). Growth and Morbidity of Gambian Infants are Influenced by Maternal Milk Oligosaccharides and Infant Gut Microbiota. *Sci Rep* 7, 40466. doi: 10.1038/srep40466
- Davis, W. C., and Hamilton, M. J. (2008). Use of flow cytometry to develop and characterize a set of monoclonal antibodies specific for rabbit leukocyte differentiation molecules. *Journal of Veterinary Science* 9, 51–66. doi: 10.4142/jvs.2008.9.1.51
- de Boer, R., Peters, R., Gierveld, S., Schuurman, T., Kooistra-Smid, M., and Savelkoul, P. (2010). Improved detection of microbial DNA after bead-beating before DNA isolation. *Journal of Microbiological Methods* 80, 209–211. doi: 10.1016/j.mimet.2009.11.009
- de Greeff, A., Resink, J. W., van Hees, H. M. J., Ruuls, L., Klaassen, G. J., Rouwers, S. M. G., et al. (2016). Supplementation of piglets with nutrient-dense complex milk replacer improves intestinal development and microbial fermentation1. *Journal of Animal Science* 94, 1012–1019. doi: 10.2527/jas.2015-9481
- de Kivit, S., Kraneveld, A. D., Knippels, L. M. J., van Kooyk, Y., Garssen, J., and Willemsen, L. E. M. (2013). Intestinal Epithelium-Derived Galectin-9 Is Involved in the Immunomodulating Effects of Nondigestible Oligosaccharides. *Journal of Innate Immunity* 5, 625–638. doi: 10.1159/000350515
- Debray, L., Fortun-Lamothe, L., and Gidenne, T. (2002). Influence of low dietary starch/fibre ratio around weaning on intake behaviour, performance and health status of young and rabbit does. *Animal Research* 51, 63–75. doi: 10.1051/animres:2002001
- Deutzmann, J. S., Callander, G., Gu, W., Müller, A. L., McCully, A. L., Ahn, J. K., et al. (2022). Low-Cost Clamp-On Photometers (ClampOD) and Tube Photometers (TubeOD) for Online Cell Density Determination. *Frontiers in Microbiology* 12. doi: 10.3389/fmicb.2021.790576
- Dias, A. M., Correia, A., Pereira, M. S., Almeida, C. R., Alves, I., Pinto, V., et al. (2018). Metabolic control of T cell immune response through glycans in inflammatory bowel disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, E4651–E4660. doi: 10.1073/pnas.1720409115
- Difilippo, E., Pan, F., Logtenberg, M., Willems, R. (H. A. M.), Braber, S., Fink-Gremmels, J., et al. (2016). Milk Oligosaccharide Variation in Sow Milk and Milk Oligosaccharide Fermentation in Piglet Intestine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 2087–2093. doi: 10.1021/acs.jafc.6b00497
- Difilippo, E., Willems, H. A. M., Vendrig, J. C., Fink-Gremmels, J., Gruppen, H., and Schols, H. A. (2015). Comparison of milk oligosaccharides pattern in colostrum of different horse breeds. *Journal of agricultural and food chemistry* 63, 4805–4814. doi: 10.1021/acs.jafc.5b01127

- Dividich, J. L., Rooke, J. A., and Herpin, P. (2005). Nutritional and immunological importance of colostrum for the new-born pig. *The Journal of Agricultural Science* 143, 469–485. doi: 10.1017/S0021859605005642
- Dong, B., Lin, X., Jing, X., Hu, T., Zhou, J., Chen, J., et al. (2022). A Bacterial Genome and Culture Collection of Gut Microbial in Weanling Piglet. *Microbiology Spectrum* 10, e02417-21. doi: 10.1128/spectrum.02417-21
- Dong, Y., Han, M., Fei, T., Liu, H., and Gai, Z. (2024). Utilization of diverse oligosaccharides for growth by Bifidobacterium and Lactobacillus species and their in vitro co-cultivation characteristics. *Int Microbiol* 27, 941–952. doi: 10.1007/s10123-023-00446-x
- Donovan, J. A., and Koretzky, G. A. (1993). CD45 and the immune response. *Journal of the American Society of Nephrology* 4, 976–985. doi: 10.1681/ASN.V44976
- Dotz, V., Rudloff, S., Meyer, C., Lochnit, G., and Kunz, C. (2015). Metabolic fate of neutral human milk oligosaccharides in exclusively breast-fed infants. *Molecular nutrition & food research* 59, 355–364. doi: 10.1002/mnfr.201400160
- Duncan, S. H., Louis, P., Thomson, J. M., and Flint, H. J. (2009). The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology* 11, 2112–2122. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01931.x
- Durham, S. D., Wei, Z., Lemay, D. G., Lange, M. C., and Barile, D. (2023). Creation of a milk oligosaccharide database, MilkOligoDB, reveals common structural motifs and extensive diversity across mammals. *Scientific Reports* 13, 10345. doi: 10.1038/s41598-023-36866-y
- Egan, M., O’Connell Motherway, M., Ventura, M., and van Sinderen, D. (2014). Metabolism of Sialic Acid by Bifidobacterium breve UCC2003. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 4414–4426. doi: 10.1128/AEM.01114-14
- Eiwegger, T., Stahl, B., Haidl, P., Schmitt, J., Boehm, G., Dehlink, E., et al. (2010). Prebiotic oligosaccharides: In vitro evidence for gastrointestinal epithelial transfer and immunomodulatory properties. *Pediatric allergy and immunology* 21, 1179–1188. doi: 10.1111/j.1399-3038.2010.01062.x
- Eiwegger, T., Stahl, B., Schmitt, J., Boehm, G., Gerstmayr, M., Pichler, J., et al. (2004). Human Milk-Derived Oligosaccharides and Plant-Derived Oligosaccharides Stimulate Cytokine Production of Cord Blood T-Cells In Vitro. *Pediatric Research* 56, 536–540. doi: 10.1203/01.PDR.0000139411.35619.B4
- El-Hawiet, A., Kitova, E. N., and Klassen, J. S. (2015). Recognition of human milk oligosaccharides by bacterial exotoxins. *Glycobiology* 25, 845–854. doi: 10.1093/glycob/cwv025
- El-Sayiad, G. A., Habeeb, A. a. M., and El-Maghawry, A. M. (1994). A note on the effects of breed, stage of lactation and pregnancy status on milk composition of rabbits. *Animal Science* 58, 153–157. doi: 10.1017/S0003356100007194
- Engfer, M. B., Stahl, B., Finke, B., Sawatzki, G., and Daniel, H. (2000). Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal

- tract. *The American Journal of Clinical Nutrition* 71, 1589–1596. doi: 10.1093/ajcn/71.6.1589
- Erney, R., Hilty, M., Pickering, L., Ruiz-Palacios, G., and Prieto, P. (2001). Human milk oligosaccharides - A novel method provides insight into human genetics. *Bioactive components of human milk* 501, 285–297.
- Eussen, S. R. B. M., Mank, M., Kottler, R., Hoffmann, X.-K., Behne, A., Rapp, E., et al. (2021). Presence and Levels of Galactosyllactoses and Other Oligosaccharides in Human Milk and Their Variation during Lactation and According to Maternal Phenotype. *Nutrients* 13, 2324. doi: 10.3390/nu13072324
- Evans, J. C., McEneaney, V. L., Coyne, M. J., Caldwell, E. P., Sheahan, M. L., Von, S. S., et al. (2022). A proteolytically activated antimicrobial toxin encoded on a mobile plasmid of Bacteroidales induces a protective response. *Nature Communications* 13, 4258. doi: 10.1038/s41467-022-31925-w
- Fajjes, M., Castejón-Vilatersana, M., Val-Cid, C., and Planas, A. (2019). Enzymatic and cell factory approaches to the production of human milk oligosaccharides. *Biotechnology advances* 37, 667–697. doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.03.014
- Fan, Y., Vinjamuri, A., Tu, D., Lebrilla, C. B., and Donovan, S. M. (2023). Determinants of human milk oligosaccharides profiles of participants in the STRONG kids 2 cohort. *Frontiers in Nutrition* 10. doi: 10.3389/fnut.2023.1105668
- Farhana, A., and Khan, Y. S. (2025). “Biochemistry, Lipopolysaccharide,” in *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554414/>
- Farkas, A. M., Panea, C., Goto, Y., Nakato, G., Galan-Diez, M., Narushima, S., et al. (2015). Induction of Th17 cells by segmented filamentous bacteria in the murine intestine. *Journal of Immunological Methods* 421, 104–111. doi: 10.1016/j.jim.2015.03.020
- Feile, A., Wegner, V. D., Raasch, M., and Mosig, A. S. (2024). Immunocompetent Intestine-on-Chip Model for Analyzing Gut Mucosal Immune Responses. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*, e66603. doi: 10.3791/66603
- Feng, Y., Wang, Y., Wang, P., Huang, Y., and Wang, F. (2018). Short-Chain Fatty Acids Manifest Stimulative and Protective Effects on Intestinal Barrier Function Through the Inhibition of NLRP3 Inflammasome and Autophagy. *Cellular Physiology and Biochemistry* 49, 190–205. doi: 10.1159/000492853
- Fenske, G. J., Ghimire, S., Antony, L., Christopher-Hennings, J., and Scaria, J. (2020). Integration of culture-dependent and independent methods provides a more coherent picture of the pig gut microbiome. *FEMS Microbiology Ecology* 96, fiae022. doi: 10.1093/femsec/fiae022
- Feofanova, N. A., Bets, V. D., Borisova, M. A., and Litvinova, E. A. (2022). L-fucose reduces gut inflammation due to T-regulatory response in Muc2 null mice. *PLOS ONE* 17, e0278714. doi: 10.1371/journal.pone.0278714

- Finke, B., Stahl, B., Pfenninger, A., Karas, M., Daniel, H., and Sawatzki, G. (1999). Analysis of high-molecular-weight oligosaccharides from human milk by liquid chromatography and MALDI-MS. *Analytical Chemistry* 71, 3755–3762. doi: 10.1021/ac990094z
- Fiocchi, C. (2008). What is “physiological” intestinal inflammation and how does it differ from “pathological” inflammation?: *Inflammatory Bowel Diseases* 14, S77–S78. doi: 10.1002/ibd.20618
- Fleming, E., Pabst, V., Scholar, Z., Xiong, R., Voigt, A. Y., Zhou, W., et al. (2021). Cultivation of common bacterial species and strains from human skin, oral, and gut microbiota. *BMC Microbiology* 21, 278. doi: 10.1186/s12866-021-02314-y
- Fondi, M., Bosi, E., Presta, L., Natoli, D., and Fani, R. (2016). Modelling microbial metabolic rewiring during growth in a complex medium. *BMC Genomics* 17, 970. doi: 10.1186/s12864-016-3311-0
- Fong, B., Ma, K., and McJarrow, P. (2011). Quantification of Bovine Milk Oligosaccharides Using Liquid Chromatography-Selected Reaction Monitoring-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 9788–9795. doi: 10.1021/jf202035m
- Fouhy, F., Deane, J., Rea, M. C., O’Sullivan, Ó., Ross, R. P., O’Callaghan, G., et al. (2015). The Effects of Freezing on Faecal Microbiota as Determined Using MiSeq Sequencing and Culture-Based Investigations. *PLoS ONE* 10, e0119355. doi: 10.1371/journal.pone.0119355
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., and O’Mahony, J. A. (2015). “Biologically Active Compounds in Milk,” in *Dairy Chemistry and Biochemistry*, (Cham: Springer International Publishing), 415–497. doi: 10.1007/978-3-319-14892-2\_11
- Fraga, M. J., Lorente, M., Carabaño, R. M., and Blas, J. C. de (1989). Effect of diet and of remating interval on milk production and milk composition of the doe rabbit. *Animal Science* 48, 459–466. doi: 10.1017/S0003356100040460
- Frese, S. A., Parker, K., Calvert, C. C., and Mills, D. A. (2015). Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning. *Microbiome* 3, 28. doi: 10.1186/s40168-015-0091-8
- Frohmeyer, H., and Elling, L. (2023). Enzyme cascades for the synthesis of nucleotide sugars: Updates to recent production strategies. *Carbohydrate Research* 523, 108727. doi: 10.1016/j.carres.2022.108727
- Fu, J., Wei, B., Wen, T., Johansson, M. E. V., Liu, X., Bradford, E., et al. (2011). Loss of intestinal core 1–derived O-glycans causes spontaneous colitis in mice. *Journal of Clinical Investigation* 121, 1657–1666. doi: 10.1172/JCI45538
- Fukuda, K., Yamamoto, A., Ganzorig, K., Khuukhenbaatar, J., Senda, A., Saito, T., et al. (2010). Chemical characterization of the oligosaccharides in Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) milk and colostrum. *Journal of Dairy Science* 93, 5572–5587. doi: 10.3168/jds.2010-3151
- Galinier, A. (2018). La répression catabolique ou comment les bactéries choisissent leurs sucres préférés. *médecine/sciences* 34, 531–539. doi: 10.1051/medsci/20183406012

- Gallois, M., Gidenne, T., Fortun-Lamothe, L., Le Huerou-Luron, I., and Lallès, J.-P. (2005). An early stimulation of solid feed intake slightly influences the morphological gut maturation in the rabbit. *Reproduction, Nutrition, Development* 45, 109–122. doi: 10.1051/rnd:2005008
- Gan, J., Bornhorst, G. M., Henrick, B. M., and German, J. B. (2018). Protein Digestion of Baby Foods: Study Approaches and Implications for Infant Health. *Molecular Nutrition & Food Research* 62, 1700231. doi: 10.1002/mnfr.201700231
- Gao, Y., Flori, L., Lecardonnel, J., Esquerré, D., Hu, Z.-L., Teillaud, A., et al. (2010). Transcriptome analysis of porcine PBMCs after in vitro stimulation by LPS or PMA/ionomycin using an expression array targeting the pig immune response. *BMC Genomics* 11, 292. doi: 10.1186/1471-2164-11-292
- Garádi, Z., Dancsó, A., Piskarev, V., and Béni, S. (2025). From mother's milk to structural insights: 1H–15N NMR analysis of Lewis X antigen-bearing oligosaccharides isolated from human milk. *Carbohydrate Polymers* 347, 122534. doi: 10.1016/j.carbpol.2024.122534
- Garber, J. M., Nothaft, H., Pluvillage, B., Stahl, M., Bian, X., Porfirio, S., et al. (2020). The gastrointestinal pathogen *Campylobacter jejuni* metabolizes sugars with potential help from commensal *Bacteroides vulgatus*. *Communications Biology* 3, 1–11. doi: 10.1038/s42003-019-0727-5
- García-López, M., Meier-Kolthoff, J. P., Tindall, B. J., Gronow, S., Woyke, T., Kyrpides, N. C., et al. (2019). Analysis of 1,000 Type-Strain Genomes Improves Taxonomic Classification of Bacteroidetes. *Frontiers in Microbiology* 10, 2083. doi: 10.3389/fmicb.2019.02083
- Garrido, D., Dallas, D. C., and Mills, D. A. (2013). Consumption of human milk glycoconjugates by infant-associated bifidobacteria: mechanisms and implications. *Microbiology* 159, 649–664. doi: 10.1099/mic.0.064113-0
- Garrido, D., Ruiz-Moyano, S., Kirmiz, N., Davis, J. C., Totten, S. M., Lemay, D. G., et al. (2016). A novel gene cluster allows preferential utilization of fucosylated milk oligosaccharides in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* SC596. *Scientific Reports* 6, 35045. doi: 10.1038/srep35045
- Garrido, D., Ruiz-Moyano, S., Lemay, D. G., Sela, D. A., German, J. B., and Mills, D. A. (2015). Comparative transcriptomics reveals key differences in the response to milk oligosaccharides of infant gut-associated bifidobacteria. *Scientific Reports* 5, 13517. doi: 10.1038/srep13517
- Gauhe, A., György, P., Hoover, J. R. E., Kuhn, R., Rose, C. S., Ruelius, H. W., et al. (1954). Bifidus factor. IV. Preparations obtained from human milk. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 48, 214–224. doi: 10.1016/0003-9861(54)90326-4
- Gennari, A., Ban, M., Braun, A., Casati, S., Corsini, E., Dastyh, J., et al. (2005). The Use of In Vitro Systems for Evaluating Immunotoxicity: The Report and Recommendations of an ECVAM Workshop. *Journal of Immunotoxicology* 2, 61–83. doi: 10.1080/15476910590965832

- Georgi, G., Bartke, N., Wiens, F., and Stahl, B. (2013). Functional glycans and glycoconjugates in human milk. *The American Journal of Clinical Nutrition* 98, 578S-585S. doi: 10.3945/ajcn.112.039065
- Gharib, H., AbdelFattah, A., Mohammed, H., and AbdelFattah, D. (2018). Weaning induces changes in behavior and stress indicators in young New Zealand rabbits. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* 5, 166. doi: 10.5455/javar.2018.e262
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., et al. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 14, 491–502. doi: 10.1038/nrgastro.2017.75
- Gidenne, T., and Fortun-Lamothe, L. (2002). Feeding strategy for young rabbits around weaning: a review of digestive capacity and nutritional needs. *Animal Science* 75, 169–184. doi: 10.1017/S1357729800052942
- Gidenne, T., García, J., Lebas, F., and Licois, D. (2010). “Nutrition and feeding strategy: interactions with pathology.,” in *Nutrition of the rabbit*, eds. C. de Blas and J. Wiseman (UK: CABI), 179–199. doi: 10.1079/9781845936693.0179
- Gidenne, T., Jehl, N., Segura, M., and Michalet-Doreau, B. (2002). Microbial activity in the caecum of the rabbit around weaning: impact of a dietary fibre deficiency and of intake level. *Animal Feed Science and Technology* 99, 107–118. doi: 10.1016/S0377-8401(02)00138-4
- Gidenne, T., Lebas, F., and Fortun-Lamothe, L. (2020a). “Feeding behaviour of rabbits.,” in *Nutrition of the rabbit*, 254–274. doi: 10.1079/9781789241273.0254
- Gidenne, T., Lebas, F., Licois, D., and García, J. (2020b). “Nutrition and feeding strategy: impacts on health status.,” in *Nutrition of the rabbit*, 193–221. doi: 10.1079/9781789241273.0193
- Gidenne, T., and Licois, D. (2005). Effect of a high fibre intake on the resistance of the growing rabbit to an experimental inoculation with an enteropathogenic strain of *Escherichia coli*. *Animal Science* 80, 281–288. doi: 10.1079/ASC41570281
- Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., et al. (2006). Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science* 312, 1355–1359. doi: 10.1126/science.1124234
- Gnoth, M. J., Kunz, C., Kinne-Saffran, E., and Rudloff, S. (2000). Human Milk Oligosaccharides Are Minimally Digested In Vitro. *The Journal of Nutrition* 130, 3014–3020. doi: 10.1093/jn/130.12.3014
- Gnoth, M. J., Rudloff, S., Kunz, C., and Kinne, R. K. H. (2001). Investigations of the in Vitro Transport of Human Milk Oligosaccharides by a Caco-2 Monolayer Using a Novel High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Technique. *Journal of Biological Chemistry* 276, 34363–34370. doi: 10.1074/jbc.M104805200

- Goehring, K. C., Kennedy, A. D., Prieto, P. A., and Buck, R. H. (2014). Direct Evidence for the Presence of Human Milk Oligosaccharides in the Circulation of Breastfed Infants. *PLoS ONE* 9, e101692. doi: 10.1371/journal.pone.0101692
- Goehring, K. C., Marriage, B. J., Oliver, J. S., Wilder, J. A., Barrett, E. G., and Buck, R. H. (2016). Similar to Those Who Are Breastfed, Infants Fed a Formula Containing 2'-Fucosyllactose Have Lower Inflammatory Cytokines in a Randomized Controlled Trial. *The Journal of Nutrition* 146, 2559–2566. doi: 10.3945/jn.116.236919
- Gonzalez-Prendes, R., Crooijmans, R. P. M. A., Dibbits, B., Laport, K., Breunig, S., Keijzer, P., et al. (2024). Genetic and environmental factors shaping goat milk oligosaccharide composition. *Journal of Dairy Science* 107, 11214–11223. doi: 10.3168/jds.2024-25132
- Goto, K., Fukuda, K., Senda, A., Saito, T., Kimura, K., Glander, K. E., et al. (2010). Chemical characterization of oligosaccharides in the milk of six species of New and Old world monkeys. *Glycoconjugate Journal* 27, 703–715. doi: 10.1007/s10719-010-9315-0
- Gotoh, A., Katoh, T., Sakanaka, M., Ling, Y., Yamada, C., Asakuma, S., et al. (2018). Sharing of human milk oligosaccharides degradants within bifidobacterial communities in faecal cultures supplemented with *Bifidobacterium bifidum*. *Scientific Reports* 8, 13958. doi: 10.1038/s41598-018-32080-3
- Gray, T. E., Narayana, K., Garner, A. M., Bakker, S. A., Yoo, R. K. H., Fischer-Tlustos, A. J., et al. (2021). Analysis of the biosynthetic flux in bovine milk oligosaccharides reveals competition between sulfated and sialylated species and the existence of glucuronic acid-containing analogues. *Food chemistry* 361, 130143. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130143
- Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Fleury, M. A., Van de Wiele, T., Forano, E., and Blanquet-Diot, S. (2017). Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health. *Trends in Microbiology* 25, 851–873. doi: 10.1016/j.tim.2017.05.004
- Grigalevičiūtė, R., Matusevičius, P., Plančiūnienė, R., Stankevičius, R., Radzevičiūtė-Valčiukė, E., Balevičiūtė, A., et al. (2023). Understanding the Immunomodulatory Effects of Bovine Colostrum: Insights into IL-6/IL-10 Axis-Mediated Inflammatory Control. *Veterinary Sciences* 10, 519. doi: 10.3390/vetsci10080519
- Grimmonprez, L. (1971). Les glucides du lait. *Annales de la nutrition et de l'alimentation*.
- Grondin, J. M., Tamura, K., Déjean, G., Abbott, D. W., and Brumer, H. (2017). Polysaccharide Utilization Loci: Fueling Microbial Communities. *Journal of Bacteriology* 199. doi: 10.1128/JB.00860-16
- Groot, N. de, Fariñas, F., Cabrera-Gómez, C. G., Pallares, F. J., and Ramis, G. (2021). Weaning causes a prolonged but transient change in immune gene expression in the intestine of piglets. *Journal of Animal Science* 99, skab065. doi: 10.1093/jas/skab065
- Groschwitz, K. R., and Hogan, S. P. (2009). Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 124, 3–20. doi: 10.1016/j.jaci.2009.05.038

- György, P., Kuhn, R., Rose, C. S., and Zilliken, F. (1954). Bifidus factor. II. Its occurrence in milk from different species and in other natural products. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 48, 202–208. doi: 10.1016/0003-9861(54)90324-0
- Haeuw-Fievre, S., Wieruszkeski, J. M., Plancke, Y., Michalski, J. C., Montreuil, J., and Strecker, G. (1993). Primary structure of human milk octa-, dodeca- and tridecasaccharides determined by a combination of 1H-NMR spectroscopy and fast-atom-bombardment mass spectrometry. Evidence for a new core structure, the para-lacto-N-octaose. *European Journal of Biochemistry* 215, 361–371. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18042.x
- Hammoudi, N., Hamoudi, S., Bonnereau, J., Bottois, H., Pérez, K., Bezault, M., et al. (2022). Autologous organoid co-culture model reveals T cell-driven epithelial cell death in Crohn's Disease. *Frontiers in Immunology* 13. doi: 10.3389/fimmu.2022.1008456
- Han, Y., Zhao, Q., Tang, C., Li, Y., Zhang, K., Li, F., et al. (2020). Butyrate Mitigates Weanling Piglets From Lipopolysaccharide-Induced Colitis by Regulating Microbiota and Energy Metabolism of the Gut–Liver Axis. *Front. Microbiol.* 11. doi: 10.3389/fmicb.2020.588666
- Hanisch, F.-G., and Kunz, C. (2021). Novel Class of Human Milk Oligosaccharides Based on 6'-Galactosyllactose Containing N-Acetylglucosamine Branches Extended by Oligogalactoses. *Journal of Proteome Research* 20, 3865–3874. doi: 10.1021/acs.jproteome.1c00154
- Hansen, L. H. B., Lauridsen, C., Nielsen, B., Jørgensen, L., and Canibe, N. (2022). Impact of early inoculation of probiotics to suckling piglets on postweaning diarrhoea – A challenge study with Enterotoxigenic *E. Coli* F18. *animal* 16, 100667. doi: 10.1016/j.animal.2022.100667
- Harayama, T., Tsukahara, T., Fukuta, K., Oda, M., and Inoue, R. (2022). Immunocyte Populations Observed from Birth to Weaning in Blood, Spleen and Mesenteric Lymph Nodes of Piglets. *Animals* 12, 1445. doi: 10.3390/ani12111445
- Harrigan, W. F. (1998). *Laboratory Methods in Food Microbiology.*, 3rd Edn. Gulf Professional Publishing.
- Hart, A. L. (2004). Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* 53, 1602–1609. doi: 10.1136/gut.2003.037325
- Harvey, D. J., Merry, A. H., Royle, L., Campbell, M. P., Dwek, R. A., and Rudd, P. M. (2009). Proposal for a standard system for drawing structural diagrams of N- and O-linked carbohydrates and related compounds. *Proteomics* 9, 3796–3801. doi: 10.1002/pmic.200900096
- Hashimoto, R., Nishiyama, K., Namai, F., Suzuki, K., Sakuma, T., Fukuda, I., et al. (2025). Milk sialyl-oligosaccharides mediate the early colonization of gut commensal microbes in piglets. *Microbiome* 13, 135. doi: 10.1186/s40168-025-02129-3
- Haslam, S. M., Freedberg, D. I., Mulloy, B., Dell, A., Stanley, P., and Prestegard, J. H. (2022). "Structural Analysis of Glycans," in *Essentials of Glycobiology*, eds. A. Varki, R. D.

- Cummings, J. D., Esko, P., Stanley, G. W., Hart, M., Aebi, et al. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- He, R., Li, Y., Han, C., Lin, R., Qian, W., and Hou, X. (2019). L-Fucose ameliorates DSS-induced acute colitis *via* inhibiting macrophage M1 polarization and inhibiting NLRP3 inflammasome and NF- $\kappa$ B activation. *International Immunopharmacology* 73, 379–388. doi: 10.1016/j.intimp.2019.05.013
- He, Y., Liu, S., Kling, D., Leone, S., Lawlor, N., Huang, Y., et al. (2016). The human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose modulates CD14 expression in human enterocytes, thereby attenuating LPS-induced inflammation. *Gut* 65, 33–+. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307544
- He, Y., Liu, S., Leone, S., and Newburg, D. S. (2014). Human colostrum oligosaccharides modulate major immunologic pathways of immature human intestine. *Mucosal Immunology* 7, 1326–1339. doi: 10.1038/mi.2014.20
- Henry, S., Oriol, R., and Samuelsson, B. (1995). Lewis Histo-Blood Group System and Associated Secretory Phenotypes. *Vox Sanguinis* 69, 166–182. doi: 10.1111/j.1423-0410.1995.tb02591.x
- Heo, P. S., Kim, D. H., Jang, J. C., Hong, J. S., and Kim, Y. Y. (2018). Effects of different creep feed types on pre-weaning and post-weaning performance and gut development. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 31, 1956–1962. doi: 10.5713/ajas.17.0844
- Hester, S. N., Chen, X., Li, M., Monaco, M. H., Comstock, S. S., Kuhlenschmidt, T. B., et al. (2013). Human milk oligosaccharides inhibit rotavirus infectivity in vitro and in acutely infected piglets. *The British journal of nutrition* 110, 1233–1242. doi: 10.1017/S0007114513000391
- Hirabayashi, J., Hashidate, T., Arata, Y., Nishi, N., Nakamura, T., Hirashima, M., et al. (2002). Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1572, 232–254. doi: 10.1016/S0304-4165(02)00311-2
- Hirschmugl, B., Brandl, W., Csapo, B., van Poppel, M., Köfeler, H., Desoye, G., et al. (2019). Evidence of Human Milk Oligosaccharides in Cord Blood and Maternal-to-Fetal Transport across the Placenta. *Nutrients* 11, 2640. doi: 10.3390/nu11112640
- Hoeflinger, J. L., Davis, S. R., Chow, J., and Miller, M. J. (2015). In vitro impact of human milk oligosaccharides on Enterobacteriaceae growth. *Journal of agricultural and food chemistry* 63, 3295–3302. doi: 10.1021/jf505721p
- Holscher, H. D., Bode, L., and Tappenden, K. A. (2017). Human Milk Oligosaccharides Influence Intestinal Epithelial Cell Maturation In Vitro. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 64, 296–301. doi: 10.1097/MPG.0000000000001274
- Holscher, H. D., Davis, S. R., and Tappenden, K. A. (2014). Human milk oligosaccharides influence maturation of human intestinal Caco-2Bbe and HT-29 cell lines. *The Journal of nutrition* 144, 586–591. doi: 10.3945/jn.113.189704

- Hong, P., Ninonuevo, M. R., Lee, B., Lebrilla, C., and Bode, L. (2008). Human milk oligosaccharides reduce HIV-1-gp120 binding to dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN). *British Journal of Nutrition* 101, 482–486. doi: 10.1017/S0007114508025804
- Hooper, L. V., and Macpherson, A. J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology* 10, 159–169. doi: 10.1038/nri2710
- Hooper, L. V., Stappenbeck, T. S., Hong, C. V., and Gordon, J. I. (2003). Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nature Immunology* 4, 269–273. doi: 10.1038/ni888
- Hooper, L. V., Wong, M. H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P. G., and Gordon, J. I. (2001). Molecular Analysis of Commensal Host-Microbial Relationships in the Intestine. *Science* 291, 881–884. doi: 10.1126/science.291.5505.881
- Hu, C. H., Xiao, K., Luan, Z. S., and Song, J. (2013). Early weaning increases intestinal permeability, alters expression of cytokine and tight junction proteins, and activates mitogen-activated protein kinases in pigs<sup>1</sup>. *Journal of Animal Science* 91, 1094–1101. doi: 10.2527/jas.2012-5796
- Hu, P., Niu, Q., Zhu, Y., Shi, C., Wang, J., and Zhu, W. (2020). Effects of early commercial milk supplement on the mucosal morphology, bacterial community and bacterial metabolites in jejunum of the pre- and post-weaning piglets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 33, 480–489. doi: 10.5713/ajas.18.0941
- Hwang, S.-A., Kruzel, M. L., and Actor, J. K. (2016). Recombinant human lactoferrin modulates human PBMC derived macrophage responses to BCG and LPS. *Tuberculosis* 101S, S53–S62. doi: 10.1016/j.tube.2016.09.011
- Inman, C. F., Laycock, G. M., Mitchard, L., Harley, R., Warwick, J., Burt, R., et al. (2012). Neonatal Colonisation Expands a Specific Intestinal Antigen-Presenting Cell Subset Prior to CD4 T-Cell Expansion, without Altering T-Cell Repertoire. *PLoS ONE* 7, e33707. doi: 10.1371/journal.pone.0033707
- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (2006). “oligosaccharides,” in *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. doi: 10.1351/goldbook.O04289
- Ioannou, A., Knol, J., and Belzer, C. (2021). Microbial Glycoside Hydrolases in the First Year of Life: An Analysis Review on Their Presence and Importance in Infant Gut. *Frontiers in Microbiology* 12, 631282. doi: 10.3389/fmicb.2021.631282
- Iverson, S. J. (2007). Milk composition and lactation strategies across mammalian taxa: implications for hand-rearing neonates. *Proceedings of the Seventh Conference on Zoo and Wildlife Nutrition, AZA Nutrition Advisory Group, Knoxville, TN*.
- Jacquier, V., Estellé, J., Schmaltz-Panneau, B., Lecardonnel, J., Moroldo, M., Lemonnier, G., et al. (2015). Genome-wide immunity studies in the rabbit: transcriptome variations in peripheral blood mononuclear cells after in vitro stimulation by LPS or PMA-Ionomycin. *BMC Genomics* 16, 26. doi: 10.1186/s12864-015-1218-9

- Jalali, M., Saldanha, F. Y. L., and Jalali, M. (2017). *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Saint Louis: Elsevier Science.
- James, K., Bottacini, F., Contreras, J. I. S., Vigoureux, M., Egan, M., Motherway, M. O., et al. (2019). Metabolism of the predominant human milk oligosaccharide fucosyllactose by an infant gut commensal. *Scientific Reports* 9, 15427. doi: 10.1038/s41598-019-51901-7
- Janeway, C. ed. (2001). *Immunobiology 5: the immune system in health and disease.*, 5th ed. New York: Garland Pub.
- Jantscher-Krenn, E., Aigner, J., Reiter, B., Köfeler, H., Csapo, B., Desoye, G., et al. (2019). Evidence of human milk oligosaccharides in maternal circulation already during pregnancy: a pilot study. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 316, E347–E357. doi: 10.1152/ajpendo.00320.2018
- Jantscher-Krenn, E., Marx, C., and Bode, L. (2013). Human milk oligosaccharides are differentially metabolised in neonatal rats. *British Journal of Nutrition* 110, 640–650. doi: 10.1017/S0007114512005727
- Jantscher-Krenn, E., von Schirnding, L., Trötz Müller, M., Köfeler, H., Kurtovic, U., Fluhr, H., et al. (2022). Human Milk Oligosaccharides Are Present in Amniotic Fluid and Show Specific Patterns Dependent on Gestational Age. *Nutrients* 14. doi: 10.3390/nu14102065
- Jeklova, E., Leva, L., and Faldyna, M. (2007). Lymphoid organ development in rabbits: Major lymphocyte subsets. *Developmental & Comparative Immunology* 31, 632–644. doi: 10.1016/j.dci.2006.10.002
- Jenness, Robert. (1974). Biosynthesis and Composition of Milk. *Journal of Investigative Dermatology* 63, 109–118. doi: 10.1111/1523-1747.ep12678111
- Jensen, P., and Stangel, G. (1992). Behaviour of piglets during weaning in a seminatural enclosure. *Applied Animal Behaviour Science* 33, 227–238. doi: 10.1016/S0168-1591(05)80010-3
- Jepsen, S. D., Lund, A., Matwiejuk, M., Andresen, L., Christensen, K. R., and Skov, S. (2024). Human milk oligosaccharides regulate human macrophage polarization and activation in response to *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Immunology* 15. doi: 10.3389/fimmu.2024.1379042
- Jin, C., Lundstrøm, J., Korhonen, E., Luis, A. S., and Bojar, D. (2023). Breast Milk Oligosaccharides Contain Immunomodulatory Glucuronic Acid and LactiNAc. *Molecular & Cellular Proteomics* 22, 100635. doi: 10.1016/j.mcpro.2023.100635
- Jin, D. X., Zou, H. W., Liu, S. Q., Wang, L. Z., Xue, B., Wu, D., et al. (2018). The underlying microbial mechanism of epizootic rabbit enteropathy triggered by a low fiber diet. *Scientific Reports* 8, 12489. doi: 10.1038/s41598-018-30178-2
- Jin, J., Jia, J., Zhang, L., Chen, Q., Zhang, X., Sun, W., et al. (2020). Jejunal inflammatory cytokines, barrier proteins and microbiome-metabolome responses to early

- supplementary feeding of Bamei suckling piglets. *BMC Microbiology* 20, 169. doi: 10.1186/s12866-020-01847-y
- Jing, X., Lyu, J., and Xiong, J. (2023). Acetate regulates GAPDH acetylation and T helper 1 cell differentiation. *Molecular Biology of the Cell* 34, br10. doi: 10.1091/mbc.E23-02-0070
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., et al. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications* 10, 5029. doi: 10.1038/s41467-019-13036-1
- Jorgensen, J. M., Arnold, C., Ashorn, P., Ashorn, U., Chaima, D., Cheung, Y. B., et al. (2017). Lipid-Based Nutrient Supplements During Pregnancy and Lactation Did Not Affect Human Milk Oligosaccharides and Bioactive Proteins in a Randomized Trial. *The Journal of nutrition* 147, 1867–1874. doi: 10.3945/jn.117.252981
- Kamada, N., Chen, G. Y., Inohara, N., and Núñez, G. (2013). Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature Immunology* 14, 685–690. doi: 10.1038/ni.2608
- Kämpfer, A. A. M., Urbán, P., Gioria, S., Kanase, N., Stone, V., and Kinsner-Ovaskainen, A. (2017). Development of an *in vitro* co-culture model to mimic the human intestine in healthy and diseased state. *Toxicology in Vitro* 45, 31–43. doi: 10.1016/j.tiv.2017.08.011
- Karav, S., Salcedo, J., Frese, S., and Barile, D. (2018). Thoroughbred mare's milk exhibits a unique and diverse free oligosaccharide profile. *FEBS open bio* 8, 1219–1229. doi: 10.1002/2211-5463.12460
- Karlsson, K.-A. (1989). ANIMAL GLYCOSPHINGOLIPIDS AS MEMBRANE ATTACHMENT SITES FOR BACTERIA. *Annual Review of Biochemistry* 58, 309–350. doi: 10.1146/annurev.bi.58.070189.001521
- Kau, A. L., Ahern, P. P., Griffin, N. W., Goodman, A. L., and Gordon, J. I. (2011). Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature* 474, 327–336. doi: 10.1038/nature10213
- Kelly, D., Campbell, J. I., King, T. P., Grant, G., Jansson, E. A., Coutts, A. G. P., et al. (2004). Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- $\gamma$  and RelA. *Nature Immunology* 5, 104–112. doi: 10.1038/ni1018
- Kelly, J., Daly, K., Moran, A. W., Ryan, S., Bravo, D., and Shirazi-Beechey, S. P. (2017). Composition and diversity of mucosa-associated microbiota along the entire length of the pig gastrointestinal tract; dietary influences. *Environmental Microbiology* 19, 1425–1438. doi: 10.1111/1462-2920.13619
- Kelly, V., Davis, S., Berry, S., Melis, J., Spelman, R., Snell, R., et al. (2013). Rapid, quantitative analysis of 3'- and 6'-sialyllactose in milk by flow-injection analysis-mass spectrometry: Screening of milks for naturally elevated sialyllactose concentration. *Journal of Dairy Science* 96, 7684–7691. doi: 10.3168/jds.2013-6972

- Kelsall, B. (2008). Innate and adaptive mechanisms to control of pathological intestinal inflammation. *The Journal of Pathology* 214, 242–259. doi: 10.1002/path.2286
- Kennedy, M. S., Zhang, M., DeLeon, O., Bissell, J., Trigodet, F., Lolans, K., et al. (2023). Dynamic genetic adaptation of *Bacteroides thetaiotaomicron* during murine gut colonization. *Cell Reports* 42, 113009. doi: 10.1016/j.celrep.2023.113009
- Khatua, S., Simal-Gandara, J., and Acharya, K. (2021). Understanding immune-modulatory efficacy in vitro. *Chemico-Biological Interactions* 352, 109776. doi: 10.1016/j.cbi.2021.109776
- Kiely, L. J., Busca, K., Lane, J. A., van Sinderen, D., and Hickey, R. M. (2023). Molecular strategies for the utilisation of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 47, fuad056. doi: 10.1093/femsre/fuad056
- Kijner, S., Cher, A., and Yassour, M. (2022a). The Infant Gut Commensal *Bacteroides* dorei Presents a Generalized Transcriptional Response to Various Human Milk Oligosaccharides. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12. doi: 10.3389/fcimb.2022.854122
- Kijner, S., Ennis, D., Shmorak, S., Florentin, A., and Yassour, M. (2024). CRISPR-Cas-based identification of a sialylated human milk oligosaccharides utilization cluster in the infant gut commensal *Bacteroides* dorei. *Nature Communications* 15, 105. doi: 10.1038/s41467-023-44437-y
- Kijner, S., Kolodny, O., and Yassour, M. (2022b). Human milk oligosaccharides and the infant gut microbiome from an eco-evolutionary perspective. *Current opinion in microbiology* 68, 102156. doi: 10.1016/j.mib.2022.102156
- Kim, J., Kim, Y.-J., and Kim, J. W. (2018). Bacterial Clearance Is Enhanced by  $\alpha$ 2,3- and  $\alpha$ 2,6-Sialyllactose via Receptor-Mediated Endocytosis and Phagocytosis. *Infection and Immunity* 87, e00694-18. doi: 10.1128/IAI.00694-18
- King, M., Kelly, D., and Morel, P. (2003). Aspects of intestinal immunity in the pig around weaning. *Weaning the Pig: Concepts and Consequences*, 219–257.
- Kiyohara, M., Tanigawa, K., Chaiwangsri, T., Katayama, T., Ashida, H., and Yamamoto, K. (2011). An exo- $\alpha$ -sialidase from bifidobacteria involved in the degradation of sialyloligosaccharides in human milk and intestinal glycoconjugates. *Glycobiology* 21, 437–447. doi: 10.1093/glycob/cwq175
- Kleiveland, C. R. (2015). “Peripheral Blood Mononuclear Cells,” in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, eds. K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, et al. (Cham: Springer International Publishing), 161–167. doi: 10.1007/978-3-319-16104-4\_15
- Klobasa, F., Werhahn, E., and Butler, J. E. (1981). Regulation of humoral immunity in the piglet by immunoglobulins of maternal origin. *Research in Veterinary Science* 31, 195–206. doi: 10.1016/S0034-5288(18)32494-9
- Knight, K. L., and Winstead, C. R. (1997). B Lymphocyte Development in the Rabbit. *International Reviews of Immunology* 15, 129–163. doi: 10.3109/08830189709068174

- Knoop, K. A., Gustafsson, J. K., McDonald, K. G., Kulkarni, D. H., Coughlin, P. E., McCrate, S., et al. (2017). Microbial antigen encounter during a preweaning interval is critical for tolerance to gut bacteria. *Science Immunology* 2, eaao1314. doi: 10.1126/sciimmunol.aao1314
- Kobata, A. (2010). Structures and application of oligosaccharides in human milk. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 86, 731–747. doi: 10.2183/pjab.86.731
- Kobata, A. (2017). *Structures, Classification, and Biosynthesis of Human Milk Oligosaccharides.*, eds. M. McGuire, M. McGuire, and L. Bode. doi: 10.1016/B978-0-12-802725-7.00002-6
- Kobata, A., and Ginsburg, V. (1969). Oligosaccharides of Human Milk. *Journal of Biological Chemistry* 244, 5496–5502. doi: 10.1016/S0021-9258(18)63591-4
- Kobata, A., and Ginsburg, V. (1972a). Oligosaccharides of human milk. 3. Isolation and characterization of a new hexasaccharide, lacto-N-hexaose. *The Journal of Biological Chemistry* 247, 1525–1529.
- Kobata, A., and Ginsburg, V. (1972b). Oligosaccharides of human milk. IV. Isolation and characterization of a new hexasaccharide, lacto-N-neohexaose. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 150, 273–281. doi: 10.1016/0003-9861(72)90036-7
- Kobata, A., Ginsburg, V., and Tsuda, M. (1969). Oligosaccharides of human milk: I. Isolation and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 130, 509–513. doi: 10.1016/0003-9861(69)90063-0
- Kobayashi, K. S., Chamailard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nuñez, G., et al. (2005). Nod2-Dependent Regulation of Innate and Adaptive Immunity in the Intestinal Tract. *Science* 307, 731–734. doi: 10.1126/science.1104911
- Koch, A. L. (1970). Turbidity measurements of bacterial cultures in some available commercial instruments. *Analytical Biochemistry* 38, 252–259. doi: 10.1016/0003-2697(70)90174-0
- Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., and Bäckhed, F. (2016). From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell* 165, 1332–1345. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.041
- Koliwer-Brandl, H., Siegert, N., Umnus, K., Kelm, A., Tolkach, A., Kulozik, U., et al. (2011). Lectin inhibition assays for the analysis of bioactive milk sialoglycoconjugates. *International Dairy Journal* 21, 413–420. doi: 10.1016/j.idairyj.2011.01.005
- Kong, C., Elderman, M., Cheng, L., de Haan, B. J., Nauta, A., and de Vos, P. (2019). Modulation of Intestinal Epithelial Glycocalyx Development by Human Milk Oligosaccharides and Non-Digestible Carbohydrates. *Molecular Nutrition Food Res* 63, 1900303. doi: 10.1002/mnfr.201900303
- Koning, N., Kessen, S. F. M., Van Der Voorn, J. P., Appelmelk, B. J., Jeurink, P. V., Knippels, L. M. J., et al. (2015). Human Milk Blocks DC-SIGN–Pathogen Interaction via MUC1. *Frontiers in Immunology* 6. doi: 10.3389/fimmu.2015.00112

- Konstantinov, S. R., Awati, A. A., Williams, B. A., Miller, B. G., Jones, P., Stokes, C. R., et al. (2006). Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environmental Microbiology* 8, 1191–1199. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01009.x
- Kostopoulos, I., Elzinga, J., Ottman, N., Klievink, J. T., Blijenberg, B., Aalvink, S., et al. (2020). Akkermansia muciniphila uses human milk oligosaccharides to thrive in the early life conditions in vitro. *Scientific Reports* 10, 14330. doi: 10.1038/s41598-020-71113-8
- Kovács, M., Szendro, Z., Milisits, G., Bóta, B., Bíró-Németh, E., Radnai, I., et al. (2006). Effect of nursing methods and faeces consumption on the development of the bacteroides, lactobacillus and coliform flora in the caecum of the newborn rabbits. *Reproduction Nutrition Development* 46, 205–210. doi: 10.1051/rnd:2006010
- Kuhn, R., and Baer, H. H. (1956). Die Konstitution der Lacto-N-tetraose. *Chemische Berichte* 89, 504–511. doi: 10.1002/cber.19560890246
- Kuhn, R., and Gauhe, A. (1962). Die Konstitution der Lacto-Nneotetraose. *Chemische Berichte* 95, 518–522. doi: 10.1002/cber.19620950231
- Kuntz, S., Rudloff, S., and Kunz, C. (2008). Oligosaccharides from human milk influence growth-related characteristics of intestinally transformed and non-transformed intestinal cells. *British Journal of Nutrition* 99, 462–471. doi: 10.1017/S0007114507824068
- Kuntz, S., Rudloff, S., and Kunz, C. (2019). Milk Oligosaccharides From Different Cattle Breeds Influence Growth-Related Characteristics of Intestinal Cells. *Front. Nutr.* 6. doi: 10.3389/fnut.2019.00031
- Kunz, C., and Egge, H. (2017). “Chapter 1 - From Bifidus Factor to Human Milk Oligosaccharides: A Historical Perspective on Complex Sugars in Milk,” in *Prebiotics and Probiotics in Human Milk*, eds. M. K. McGuire, M. A. McGuire, and L. Bode (San Diego: Academic Press), 3–16. doi: 10.1016/B978-0-12-802725-7.00001-4
- Kunz, C., Meyer, C., Collado, Y., Geiger, L., Garcia-Mantrana, Y., Bertua-Rios, Z., et al. (2017). Influence of Gestational Age, Secretor, and Lewis Blood Group Status on the Oligosaccharide Content of Human Milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 64, 789–798. doi: 10.1097/MPG.0000000000001402
- Kurakevich, E., Hennes, T., Hausmann, M., Rogler, G., and Borsig, L. (2013). Milk oligosaccharide sialyl( $\alpha$ 2,3)lactose activates intestinal CD11c+ cells through TLR4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 17444–17449. doi: 10.1073/pnas.1306322110
- Lagier, J.-C., Edouard, S., Pagnier, I., Mediannikov, O., Drancourt, M., and Raoult, D. (2015). Current and Past Strategies for Bacterial Culture in Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 28, 208–236. doi: 10.1128/cmr.00110-14
- Lagkouvardos, I., Overmann, J., and Clavel, T. (2017). Cultured microbes represent a substantial fraction of the human and mouse gut microbiota. *Gut Microbes* 8, 493–503. doi: 10.1080/19490976.2017.1320468
- Lahdenperä, M., Galante, L., Gonzales-Inca, C., Vahtera, J., Pentti, J., Rautava, S., et al. (2023). Residential green environments are associated with human milk oligosaccharide

- diversity and composition. *Scientific Reports* 13, 216. doi: 10.1038/s41598-022-27317-1
- Lallès, J.-P., Bosi, P., Smidt, H., and Stokes, C. R. (2007). Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proceedings of the Nutrition Society* 66, 260–268. doi: 10.1017/S0029665107005484
- Lamothe, L., Theau-Clement, M., Combes, S., Allain, D., Lebas, F., Normand, B. L., et al. (2015). “Physiologie générale,” in *Le lapin - De la biologie à l'élevage*.
- Lane, J. A., O'Callaghan, J., Carrington, S. D., and Hickey, R. M. (2013). Transcriptional response of HT-29 intestinal epithelial cells to human and bovine milk oligosaccharides. *British Journal of Nutrition* 110, 2127–2137. doi: 10.1017/S0007114513001591
- Lantz, P.-G., Matsson, M., Wadström, T., and Rådström, P. (1997). Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. *Journal of Microbiological Methods* 28, 159–167. doi: 10.1016/S0167-7012(97)00979-2
- Laucirica, D. R., Triantis, V., Schoemaker, R., Estes, M. K., and Ramani, S. (2017). Milk Oligosaccharides Inhibit Human Rotavirus Infectivity in MA104 Cells. *The Journal of Nutrition* 147, 1709–1714. doi: 10.3945/jn.116.246090
- Laurent-Bennegadi, N., Licois, D., and Gidenne, T. (2013). Nutritionally induced enteropathy in the growing rabbit: impact on caecal microbial activity and bloodmetabolic profile. *Revue de Médecine Vétérinaire* 164, 495–502.
- Lawson, M., O'Neill, I., Kujawska, M., Javavdi, S., Wijeyesekera, A., Flegg, Z., et al. (2020). Breast milk-derived human milk oligosaccharides promote Bifidobacterium interactions within a single ecosystem. *The ISME Journal* 14, 635–648. doi: 10.1038/s41396-019-0553-2
- Le Floc'h, N., Boudon, A., Montagne, L., Gilbert, H., Gondret, F., Lebret, B., et al. (2021). Santé et bien-être de la truie gestante et du porc en croissance. *INRAE Productions Animales* 34, 211–226. doi: 10.20870/productions-animales.2021.34.3.4879
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S. C. J. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology* 8, 171–184. doi: 10.1038/nrmicro2297
- Lebrilla, C. B., Liu, J., Widmalm, G., and Prestegard, J. H. (2022). “Oligosaccharides and Polysaccharides,” in *Essentials of Glycobiology*, eds. A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, et al. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Lee, H., Cuthbertson, D. J., Otter, D. E., and Barile, D. (2016). Rapid Screening of Bovine Milk Oligosaccharides in a Whey Permeate Product and Domestic Animal Milks by Accurate Mass Database and Tandem Mass Spectral Library. *Journal of agricultural and food chemistry* 64, 6364–6374. doi: 10.1021/acs.jafc.6b02039

- Lewis, Z. T., Totten, S. M., Smilowitz, J. T., Popovic, M., Parker, E., Lemay, D. G., et al. (2015). Maternal fucosyltransferase 2 status affects the gut bifidobacterial communities of breastfed infants. *Microbiome* 3, 13. doi: 10.1186/s40168-015-0071-z
- Li, B., Schroyen, M., Leblois, J., Wavreille, J., Soyeurt, H., Bindelle, J., et al. (2018). Effects of inulin supplementation to piglets in the suckling period on growth performance, postileal microbial and immunological traits in the suckling period and three weeks after weaning. *Archives of Animal Nutrition* 72, 425–442. doi: 10.1080/1745039X.2018.1508975
- Li, D., Chen, D., Yu, B., Luo, Y., and He, J. (2022a). Effect of sialyllactose administration on growth performance and intestinal epithelium development in suckling piglets. *Animal Feed Science and Technology* 284, 115205. doi: 10.1016/j.anifeeds.2022.115205
- Li, D., and Wu, M. (2021). Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6, 1–24. doi: 10.1038/s41392-021-00687-0
- Li, H., Lane, J. A., Chen, J., Lu, Z., Wang, H., Dhital, S., et al. (2022b). *In vitro* fermentation of human milk oligosaccharides by individual *Bifidobacterium longum*-dominant infant fecal inocula. *Carbohydrate Polymers* 287, 119322. doi: 10.1016/j.carbpol.2022.119322
- Li, J., Bi, Y., Zheng, Y., Cao, C., Yu, L., Yang, Z., et al. (2022c). Development of high-throughput UPLC-MS/MS using multiple reaction monitoring for quantitation of complex human milk oligosaccharides and application to large population survey of secretor status and Lewis blood group. *Food Chem* 397, 133750. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133750
- Li, M., Monaco, M. H., Wang, M., Comstock, S. S., Kuhlenschmidt, T. B., Fahey Jr, G. C., et al. (2014). Human milk oligosaccharides shorten rotavirus-induced diarrhea and modulate piglet mucosal immunity and colonic microbiota. *The ISME Journal* 8, 1609–1620. doi: 10.1038/ismej.2014.10
- Li, X., Mao, Y., Liu, S., Wang, J., Li, X., Zhao, Y., et al. (2022d). Vitamins, Vegetables and Metal Elements Are Positively Associated with Breast Milk Oligosaccharide Composition among Mothers in Tianjin, China. *Nutrients* 14. doi: 10.3390/nu14194131
- Li, X., Yao, Z., Qian, J., Li, H., and Li, H. (2024). Lactate Protects Intestinal Epithelial Barrier Function from Dextran Sulfate Sodium-Induced Damage by GPR81 Signaling. *Nutrients* 16, 582. doi: 10.3390/nu16050582
- Licois, D., and Marlier, D. (2008). Pathologies infectieuses du lapin en élevage rationnel. *INRAE Productions Animales* 21, 257–268. doi: 10.20870/productions-animales.2008.21.3.3400
- Licois, D., Wyers, M., and Coudert, P. (2005). Epizootic Rabbit Enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. *Veterinary Research* 36, 601–613. doi: 10.1051/vetres:2005021
- Liu, L., Xu, M., Lan, R., Hu, D., Li, X., Qiao, L., et al. (2022). *Bacteroides vulgatus* attenuates experimental mice colitis through modulating gut microbiota and immune responses. *Frontiers in Immunology* 13. doi: 10.3389/fimmu.2022.1036196

- Liu, Z., Auld, M., Wright, M., Cocks, B., and Rochfort, S. (2017). Bovine Milk Oligosaccharide Contents Show Remarkable Seasonal Variation and Inter-cow Variation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65, 1307–1313. doi: 10.1021/acs.jafc.6b04098
- LoCasio, R. G., Ninonuevo, M. R., Freeman, S. L., Sela, D. A., Grimm, R., Lebrilla, C. B., et al. (2007). Glycoprofiling of Bifidobacterial Consumption of Human Milk Oligosaccharides Demonstrates Strain Specific, Preferential Consumption of Small Chain Glycans Secreted in Early Human Lactation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 8914–8919. doi: 10.1021/jf0710480
- LoCasio, R. G., Niñonuevo, M. R., Kronewitter, S. R., Freeman, S. L., German, J. B., Lebrilla, C. B., et al. (2009). A versatile and scalable strategy for glycoprofiling bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides. *Microbial Biotechnology* 2, 333–342. doi: 10.1111/j.1751-7915.2008.00072.x
- Louis, P., and Flint, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology* 19, 29–41. doi: 10.1111/1462-2920.13589
- Lozano-Ojalvo, D., López-Fandiño, R., and López-Expósito, I. (2015). “PBMC-Derived T Cells,” in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, eds. K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, et al. (Cham: Springer International Publishing), 169–180. doi: 10.1007/978-3-319-16104-4\_16
- Lu, J., Zhang, Y., Song, B., Zhang, S., Pang, X., Sari, R., et al. (2020). Comparative analysis of oligosaccharides in Guanzhong and Saanen goat milk by using LC-MS/MS. *Carbohydrate Polymers* 235. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.115965
- Lührs, H., Gerke, T., Müller, J. G., Melcher, R., Schaubert, J., Boxberger, F., et al. (2002). Butyrate Inhibits NF- $\kappa$ B Activation in Lamina Propria Macrophages of Patients with Ulcerative Colitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 37, 458–466. doi: 10.1080/003655202317316105
- Luijckx, Y. M. C. A., Bleumink, N. M. C., Jiang, J., Overkleeft, H. S., Wösten, M. M. S. M., Strijbis, K., et al. (2020). Bacteroides fragilis fucosidases facilitate growth and invasion of Campylobacter jejuni in the presence of mucins. *Cellular Microbiology* 22, e13252. doi: 10.1111/cmi.13252
- Luna, E., Parkar, S. G., Kirmiz, N., Hartel, S., Hearn, E., Hossine, M., et al. (2022). Utilization Efficiency of Human Milk Oligosaccharides by Human-Associated Akkermansia Is Strain Dependent. *Applied and Environmental Microbiology* 88, e01487-21. doi: 10.1128/AEM.01487-21
- Lundstrøm, J., and Bojar, D. (2024). The evolving world of milk oligosaccharides: Biochemical diversity understood by computational advances. *Carbohydrate Research* 537, 109069. doi: 10.1016/j.carres.2024.109069
- Luo, Y., Lan, C., Ren, W., Wu, A., Yu, B., He, J., et al. (2025). Bacteroides thetaiotaomicron: A symbiotic ally against diarrhea along with modulation of gut microbial ecological networks via tryptophan metabolism and AHR-Nrf2 signaling. *Journal of Advanced Research*. doi: 10.1016/j.jare.2025.04.016

- Lyznicki, J. M., Busch, E. L., and Blazevic, D. J. (1982). Medium for selective isolation and presumptive identification of the *Bacteroides fragilis* group. *Journal of Clinical Microbiology* 15, 123–129. doi: 10.1128/jcm.15.1.123-129.1982
- MacDonald, T. (2008). News & Highlights. *Mucosal Immunology* 1, 246–247. doi: 10.1038/mi.2008.17
- Macias Rostami, S., Bénet, T., Spears, J., Reynolds, A., Satyaraj, E., Sprenger, N., et al. (2014). Milk oligosaccharides over time of lactation from different dog breeds. *PLoS ONE* 9, e99824. doi: 10.1371/journal.pone.0099824
- Mackie, R. I., Sghir, A., and Gaskins, H. R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition* 69, 1035S–1045S. doi: 10.1093/ajcn/69.5.1035s
- Macpherson, A. J., and Harris, N. L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews Immunology* 4, 478–485. doi: 10.1038/nri1373
- Maertens L., Lebas F., and Szendro ZS. (2010). Rabbit milk: A review of quantity, quality and non-dietary affecting factors. *World rabbit sci.* 14, 205–230. doi: 10.4995/wrs.2006.565
- Manners, M. J. (1976). The development of digestive function in the pig. *Proceedings of the Nutrition Society* 35, 49–55. doi: 10.1079/PNS19760008
- Mannick, E., and Udall, J. N. (1996). Neonatal Gastrointestinal Mucosal Immunity. *Clinics in Perinatology* 23, 287–304. doi: 10.1016/S0095-5108(18)30243-4
- Marcobal, A., Barboza, M., Froehlich, J. W., Block, D. E., German, J. B., Lebrilla, C. B., et al. (2010). Consumption of Human Milk Oligosaccharides by Gut-Related Microbes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 5334–5340. doi: 10.1021/jf9044205
- Marcobal, A., Barboza, M., Sonnenburg, E. D., Pudlo, N., Martens, E. C., Desai, P., et al. (2011). *Bacteroides* in the Infant Gut Consume Milk Oligosaccharides via Mucus-Utilization Pathways. *Cell Host & Microbe* 10, 507–514. doi: 10.1016/j.chom.2011.10.007
- Marcobal, A., and Sonnenburg, J. L. (2012). Human milk oligosaccharide consumption by intestinal microbiota. *Clinical Microbiology and Infection* 18, 12–15. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03863.x
- Marino, K., Lane, J., Abrahams, J., Struwe, W., Harvey, D., Marotta, M., et al. (2011). Method for milk oligosaccharide profiling by 2-aminobenzamide labeling and hydrophilic interaction chromatography. *Glycobiology* 21, 1317–1330. doi: 10.1093/glycob/cwr067
- Marlier, D., dewree, R., Delleur, V., Licois, D., Lassence, C., Poulipoulis, A., et al. (2003). Description des principales étiologies des maladies digestives chez le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*).

- Marteyn, B., West, N. P., Browning, D. F., Cole, J. A., Shaw, J. G., Palm, F., et al. (2010). Modulation of *Shigella* virulence in response to available oxygen in vivo. *Nature* 465, 355–358. doi: 10.1038/nature08970
- Martínez, N., Hidalgo-Cantabrana, C., Delgado, S., Margolles, A., and Sánchez, B. (2019). Filling the gap between collection, transport and storage of the human gut microbiota. *Scientific Reports* 9, 8327. doi: 10.1038/s41598-019-44888-8
- Martinez-Ferez, A., Rudloff, S., Guadix, A., Henkel, C., Pohlentz, G., Boza, J., et al. (2006). Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. *International Dairy Journal* 16, 173–181. doi: 10.1016/j.idairyj.2005.02.003
- Martín-Ortiz, A., Barile, D., Salcedo, J., Moreno, F. J., Clemente, A., Ruiz-Matute, A. I., et al. (2017). Changes in Caprine Milk Oligosaccharides at Different Lactation Stages Analyzed by High Performance Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* 65, 3523–3531. doi: 10.1021/acs.jafc.6b05104
- Matharu, D., Ponsero, A. J., Lengyel, M., Meszaros-Matwiejuk, A., Kolho, K.-L., de Vos, W. M., et al. (2024). Human milk oligosaccharide composition is affected by season and parity and associates with infant gut microbiota in a birth mode dependent manner in a Finnish birth cohort. *eBioMedicine* 104, 105182. doi: 10.1016/j.ebiom.2024.105182
- Mattioli, S., Dal Bosco, A., Combes, S., Moscati, L., Crotti, S., Cartoni Mancinelli, A., et al. (2019). Dehydrated Alfalfa and Fresh Grass Supply in Young Rabbits: Effect on Performance and Caecal Microbiota Biodiversity. *Animals* 9, 341. doi: 10.3390/ani9060341
- Maurer, M., Gresnigt, M. S., Last, A., Wollny, T., Berlinghof, F., Pospich, R., et al. (2019). A three-dimensional immunocompetent intestine-on-chip model as *in vitro* platform for functional and microbial interaction studies. *Biomaterials* 220, 119396. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119396
- Maynard, C. L., and Weaver, C. T. (2008). Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. *Immunological Reviews* 226, 219–233. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00711.x
- Mazmanian, S. K., Liu, C. H., Tzianabos, A. O., and Kasper, D. L. (2005). An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. *Cell* 122, 107–118. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.007
- McGuire, M., Meehan, C., McGuire, M., Williams, J., Foster, J., Sellen, D., et al. (2017). What's normal? Oligosaccharide concentrations and profiles in milk produced by healthy women vary geographically. *American Journal of Clinical Nutrition* 105, 1086–1100. doi: 10.3945/ajcn.116.139980
- McJarrow, P., and van Amelsfort-Schoonbeek, J. (2004). Bovine sialyl oligosaccharides: seasonal variations in their concentrations in milk, and a comparison of the colostrums of Jersey and Friesian cows. *International Dairy Journal* 14, 571–579. doi: 10.1016/j.idairyj.2003.11.006

- McKee, L. S., La Rosa, S. L., Westereng, B., Eijsink, V. G., Pope, P. B., and Larsbrink, J. (2021). Polysaccharide degradation by the Bacteroidetes: mechanisms and nomenclature. *Environmental Microbiology Reports* 13, 559–581. doi: 10.1111/1758-2229.12980
- McNaught, A. D. (1996). Nomenclature of carbohydrates (IUPAC Recommendations 1996). *Pure and Applied Chemistry* 68, 1919–2008. doi: 10.1351/pac199668101919
- Mijan, M. A., Lee, Y.-K., and Kwak, H.-S. (2011). Classification, Structure, and Bioactive Functions of Oligosaccharides in Milk. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 31, 631–640. doi: 10.5851/kosfa.2011.31.5.631
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., et al. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 81, e00036-17. doi: 10.1128/MMBR.00036-17
- Mills, R. H., Dulai, P. S., Vázquez-Baeza, Y., Saucedo, C., Daniel, N., Gerner, R. R., et al. (2022). Multi-omics analyses of the ulcerative colitis gut microbiome link *Bacteroides vulgatus* proteases with disease severity. *Nature Microbiology* 7, 262–276. doi: 10.1038/s41564-021-01050-3
- Mineguchi, Y., Miyoshi, M., Taufik, E., Kawamura, A., Asakawa, T., Suzuki, I., et al. (2018). Chemical characterization of the milk oligosaccharides of some Artiodactyla species including giraffe (*Giraffa camelopardalis*), sitatunga (*Tragelaphus spekii*), deer (*Cervus nippon yesoensis*) and water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Glycoconjugate journal* 35, 561–574. doi: 10.1007/s10719-018-9849-0
- Moeser, A. J., Klok, C. V., Ryan, K. A., Wooten, J. G., Little, D., Cook, V. L., et al. (2007). Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 292, G173-181. doi: 10.1152/ajpgi.00197.2006
- Moeser, A. J., Pohl, C. S., and Rajput, M. (2017). Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. *Animal Nutrition* 3, 313–321. doi: 10.1016/j.aninu.2017.06.003
- Mokhtari, P., Schmidt, K. A., Zamanian, H., Babaei, M., Machle, C. J., Trifonova, D., et al. (2024). Maternal Diet Associated with Oligosaccharide Abundances in Human Milk from Latina Mothers. *Nutrients* 16, 1795. doi: 10.3390/nu16121795
- Momose, Y., Hirayama, K., and Itoh, K. (2008). Competition for proline between indigenous *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in gnotobiotic mice associated with infant intestinal microbiota and its contribution to the colonization resistance against *E. coli* O157:H7. *Antonie van Leeuwenhoek* 94, 165–171. doi: 10.1007/s10482-008-9222-6
- Monaco, M. H., Wang, M., Hauser, J., Yan, J., Dilger, R. N., and Donovan, S. M. (2023). Formula supplementation with human and bovine milk oligosaccharides modulates blood IgG and T-helper cell populations, and ex vivo LPS-stimulated cytokine production in a neonatal preclinical model. *Frontiers in Immunology* 14, 1327853. doi: 10.3389/fimmu.2023.1327853

- Montreuil, J. (1957). [Glucides of human milk]. *Bulletin De La Societe De Chimie Biologique* 39, 395–411.
- Mooiman, C., Bouwknecht, J., Dekker, W. J. C., Wiersma, S. J., Ortiz-Merino, R. A., de Hulster, E., et al. (2021). Critical parameters and procedures for anaerobic cultivation of yeasts in bioreactors and anaerobic chambers. *FEMS Yeast Research* 21, foab035. doi: 10.1093/femsyr/foab035
- Moore, R. E., Xu, L. L., and Townsend, S. D. (2021). Prospecting Human Milk Oligosaccharides as a Defense Against Viral Infections. *ACS Infectious Diseases* 7, 254–263. doi: 10.1021/acsinfecdis.0c00807
- Moote, P. E., Bescucci, D. M., Ortega Polo, R., Uwiera, R. R. E., and Inglis, G. D. (2021). Comparison of Strategies for Isolating Anaerobic Bacteria from the Porcine Intestine. *Applied and Environmental Microbiology* 87, e00088-21. doi: 10.1128/AEM.00088-21
- Mörbe, U. M., Jørgensen, P. B., Fenton, T. M., von Burg, N., Riis, L. B., Spencer, J., et al. (2021). Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal Immunology* 14, 793–802. doi: 10.1038/s41385-021-00389-4
- Morehead, M. S., and Scarbrough, C. (2018). Emergence of Global Antibiotic Resistance. *Primary Care: Clinics in Office Practice* 45, 467–484. doi: 10.1016/j.pop.2018.05.006
- Morrow, A., Ruiz-Palacios, G., Altaye, M., Jiang, X., Guerrero, M., Meinzen-Derr, J., et al. (2004). Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *Journal of Pediatrics* 145, 297–303. doi: 10.1016/j.jpeds.2004.04.054
- Motta, V., Luise, D., Bosi, P., and Trevisi, P. (2019). Faecal microbiota shift during weaning transition in piglets and evaluation of AO blood types as shaping factor for the bacterial community profile. *PLoS ONE* 14, e0217001. doi: 10.1371/journal.pone.0217001
- Mowat, A. Mcl. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology* 3, 331–341. doi: 10.1038/nri1057
- Mudd, A. T., Salcedo, J., Alexander, L. S., Johnson, S. K., Getty, C. M., Chichlowski, M., et al. (2016). Porcine Milk Oligosaccharides and Sialic Acid Concentrations Vary Throughout Lactation. *Frontiers in Nutrition* 3. doi: 10.3389/fnut.2016.00039
- Murphy, K., and Weaver, C. (2016). *Janeway's immunobiology.*, 9th edition. New York, NY: Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC.
- Nagy, B., and Fekete, P. Z. (2005). Enterotoxigenic Escherichia coli in veterinary medicine. *International journal of medical microbiology: IJMM* 295, 443–454. doi: 10.1016/j.ijmm.2005.07.003
- Nakamura, T., Kawase, H., Kimura, K., Watanabe, Y., Ohtani, M., Arai, I., et al. (2003). Concentrations of sialyloligosaccharides in bovine colostrum and milk during the prepartum and early lactation. *Journal of Dairy Science* 86, 1315–1320. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73715-1

- Neelamegham, S., Aoki-Kinoshita, K., Bolton, E., Frank, M., Lisacek, F., Lütteke, T., et al. (2019). Updates to the Symbol Nomenclature for Glycans guidelines. *Glycobiology* 29, 620–624. doi: 10.1093/glycob/cwz045
- Nelson, D. L., Cox, M. M., and Hoskins, A. A. (2021). *Lehninger Principles of Biochemistry*, 8th edition. Macmillan Education.
- Neurath, M. F., Finotto, S., and Glimcher, L. H. (2002). The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nature Medicine* 8, 567–573. doi: 10.1038/nm0602-567
- Neville, J., Pawlak, R., Chang, M., Furst, A., Bode, L., and Perrin, M. T. (2022). A Cross-Sectional Assessment of Human Milk Oligosaccharide Composition of Vegan, Vegetarian, and Nonvegetarian Mothers. *Breastfeeding Medicine* 17, 210–217. doi: 10.1089/bfm.2021.0259
- Newberry, R. D., and Gustafsson, J. K. (2016). “Anatomy and Function of the Gut Immune System,” in *Encyclopedia of Immunobiology*, (Elsevier), 427–433. doi: 10.1016/B978-0-12-374279-7.07006-5
- Ng, K. M., Ferreyra, J. A., Higginbottom, S. K., Lynch, J. B., Kashyap, P. C., Gopinath, S., et al. (2013). Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature* 502, 96–99. doi: 10.1038/nature12503
- Nielsen, D. S. G., Jensen, B. B., Theil, P. K., Nielsen, T. S., Knudsen, K. E. B., and Purup, S. (2018). Effect of butyrate and fermentation products on epithelial integrity in a mucus-secreting human colon cell line. *Journal of Functional Foods* 40, 9–17. doi: 10.1016/j.jff.2017.10.023
- Nigro, G., Rossi, R., Commere, P.-H., Jay, P., and Sansonetti, P. J. (2014). The Cytosolic Bacterial Peptidoglycan Sensor Nod2 Affords Stem Cell Protection and Links Microbes to Gut Epithelial Regeneration. *Cell Host & Microbe* 15, 792–798. doi: 10.1016/j.chom.2014.05.003
- Ninonuevo, M. R., Park, Y., Yin, H., Zhang, J., Ward, R. E., Clowers, B. H., et al. (2006). A Strategy for Annotating the Human Milk Glycome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7471–7480. doi: 10.1021/jf0615810
- Noel, G., Baetz, N. W., Staab, J. F., Donowitz, M., Kovbasnjuk, O., Pasetti, M. F., et al. (2017). A primary human macrophage-enteroid co-culture model to investigate mucosal gut physiology and host-pathogen interactions. *Scientific Reports* 7, 45270. doi: 10.1038/srep45270
- Nogacka, A. M., Cuesta, I., Gueimonde, M., and de los Reyes-Gavilán, C. G. (2023). 2-Fucosyllactose Metabolism by Bifidobacteria Promotes Lactobacilli Growth in Co-Culture. *Microorganisms* 11, 2659. doi: 10.3390/microorganisms11112659
- Noll, A. J., Gourdine, J.-P., Yu, Y., Lasanajak, Y., Smith, D. F., and Cummings, R. D. (2016a). Galectins are human milk glycan receptors. *Glycobiology* 26, 655–669. doi: 10.1093/glycob/cww002

- Noll, A., Yu, Y., Lasanajak, Y., Duska-McEwen, G., Buck, R., Smith, D., et al. (2016b). Human DC-SIGN binds specific human milk glycans. *Biochemical Journal* 473, 1343–1353. doi: 10.1042/BCJ20160046
- Obermeier, S., Rudloff, S., Pohlentz, G., Lentze, M. J., and Kunz, C. (1999). Secretion of <sup>13</sup>C-Labelled Oligosaccharides into Human Milk and Infant's Urine after an Oral <sup>13</sup>C-Galactose Load. *Isotopes in Environmental and Health Studies* 35, 119–125. doi: 10.1080/10256019908234084
- Oliveira, D. L., Wilbey, R. A., Grandison, A. S., and Roseiro, L. B. (2015). Milk oligosaccharides: A review. *International Journal of Dairy Technology* 68, 305–321. doi: 10.1111/1471-0307.12209
- Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M. P., Richter, J., Franke, A., et al. (2012). Microbial Exposure During Early Life Has Persistent Effects on Natural Killer T Cell Function. *Science* 336, 489–493. doi: 10.1126/science.1219328
- Oriol, R., Mollicone, R., Cailleau, A., Balanzino, L., and Breton, C. (1999). Divergent evolution of fucosyltransferase genes from vertebrates, invertebrates, and bacteria. *Glycobiology* 9, 323–334. doi: 10.1093/glycob/9.4.323
- Pabst, R., Geist, M., Rothkötter, H. J., and Fritz, F. J. (1988). Postnatal development and lymphocyte production of jejunal and ileal Peyer's patches in normal and gnotobiotic pigs. *Immunology* 64, 539–544.
- Pabst, R., and Rothkötter, H. J. (1999). Postnatal development of lymphocyte subsets in different compartments of the small intestine of piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 72, 167–173. doi: 10.1016/S0165-2427(99)00129-4
- Pacheco, A. R., Curtis, M. M., Ritchie, J. M., Munera, D., Waldor, M. K., Moreira, C. G., et al. (2012). Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization. *Nature* 492, 113–117. doi: 10.1038/nature11623
- Paës, C., Fortun-Lamothe, L., Coureaud, G., Bébin, K., Duperray, J., Gohier, C., et al. (2020). Insights into suckling rabbit feeding behaviour: acceptability of different creep feed presentations and attractiveness for sensory feed additives. *Animal* 14, 1629–1637. doi: 10.1017/S1751731120000038
- Paës, C., Gidenne, T., Bébin, K., Duperray, J., Gohier, C., Guené-Grand, E., et al. (2022). Early Introduction of Plant Polysaccharides Drives the Establishment of Rabbit Gut Bacterial Ecosystems and the Acquisition of Microbial Functions. *mSystems* 7, e00243-22. doi: 10.1128/msystems.00243-22
- Paës, C., Gidenne, T., Bébin, K., Duperray, J., Gohier, C., Guené-Grand, E., et al. (2023). L'introduction précoce d'aliment solide au début de la vie, une stratégie de pilotage du microbiote pour construire et préserver la santé du lapin. *INRAE Productions Animales* 36, 7731. doi: 10.20870/productions-animales.2023.36.3.7731
- Pajarillo, E., Chae, J.-P., P. Balolong, M., Bum Kim, H., and Kang, D.-K. (2014). Assessment of fecal bacterial diversity among healthy piglets during the weaning transition. *The Journal of General and Applied Microbiology* 60, 140–146. doi: 10.2323/jgam.60.140

- Paone, P., Latousakis, D., Terrasi, R., Vertommen, D., Jian, C., Borlandelli, V., et al. (2024). Human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose protects against high-fat diet-induced obesity by changing intestinal mucus production, composition and degradation linked to changes in gut microbiota and faecal proteome profiles in mice. *Gut* 73, 1632–1649. doi: 10.1136/gutjnl-2023-330301
- Parada Venegas, D., De la Fuente, M. K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., et al. (2019). Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Frontiers in Immunology* 10, 277. doi: 10.3389/fimmu.2019.00277
- Park, J., Kim, M., Kang, S. G., Jannasch, A. H., Cooper, B., Patterson, J., et al. (2015). Short-chain fatty acids induce both effector and regulatory T cells by suppression of histone deacetylases and regulation of the mTOR–S6K pathway. *Mucosal Immunology* 8, 80–93. doi: 10.1038/mi.2014.44
- Park, J., Kotani, T., Konno, T., Setiawan, J., Kitamura, Y., Imada, S., et al. (2016). Promotion of Intestinal Epithelial Cell Turnover by Commensal Bacteria: Role of Short-Chain Fatty Acids. *PLoS ONE* 11, e0156334. doi: 10.1371/journal.pone.0156334
- Parra, D., Takizawa, F., and Sunyer, J. O. (2013). Evolution of B Cell Immunity. *Annual Review of Animal Biosciences* 1, 65–97. doi: 10.1146/annurev-animal-031412-103651
- Pascual, J. J., Cervera, C., Blas, E., and Fernández-Carmona, J. (1999). Effect of high fat diets on the performance, milk yield and milk composition of multiparous rabbit does. *Animal Science* 68, 151–162. doi: 10.1017/S1357729800050177
- Pasternak, J. A. (2014). Grouping Pig-Specific Responses to Mitogen with Similar Responder Animals may Facilitate the Interpretation of Results Obtained in an Out-Bred Animal Model. *Journal of Vaccines & Vaccination* 05. doi: 10.4172/2157-7560.1000242
- Paul, M., Leblanc-Maridor, M., Rousset, N., Hemonic, A., Marguerie, J., Coz, P. le, et al. (2022). Réduction de l'usage des antibiotiques en filières monogastriques : état d'avancement et perspectives: (Full text available in English). *INRAE Productions Animales* 35, 293–306. doi: 10.20870/productions-animales.2022.35.4.7322
- Pedro, V., and Fourdin, S. (2024). L'élevage de lapin de chair en France Résultats technico-économiques 2022. *ITAVI*.
- Perdijk, O., van Baarlen, P., Fernandez-Gutierrez, M. M., van den Brink, E., Schuren, F. H. J., Brugman, S., et al. (2019). Sialyllactose and Galactooligosaccharides Promote Epithelial Barrier Functioning and Distinctly Modulate Microbiota Composition and Short Chain Fatty Acid Production In Vitro. *Frontiers in immunology* 10, 94. doi: 10.3389/fimmu.2019.00094
- Perdijk, O., van Neerven, R. J. J., Meijer, B., Savelkoul, H. F. J., and Brugman, S. (2018). Induction of human tolerogenic dendritic cells by 3'-sialyllactose via TLR4 is explained by LPS contamination. *Glycobiology* 28, 126–130. doi: 10.1093/glycob/cwx106
- Perey, D. Y., and Good, R. A. (1968). Experimental arrest and induction of lymphoid development in intestinal lymphoepithelial tissues of rabbits. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 18, 15–26.

- Petersson, J., Schreiber, O., Hansson, G. C., Gendler, S. J., Velcich, A., Lundberg, J. O., et al. (2011). Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 300, G327–G333. doi: 10.1152/ajpgi.00422.2010
- Petri, D., Hill, J. E., and Van Kessel, A. G. (2010). Microbial succession in the gastrointestinal tract (GIT) of the preweaned pig. *Livestock Science* 133, 107–109. doi: 10.1016/j.livsci.2010.06.037
- Phalipon, A., Cardona, A., Kraehenbuhl, J.-P., Edelman, L., Sansonetti, P. J., and Corthésy, B. (2002). Secretory Component: A New Role in Secretory IgA-Mediated Immune Exclusion In Vivo. *Immunity* 17, 107–115. doi: 10.1016/S1074-7613(02)00341-2
- Pham, T. A. N., Clare, S., Goulding, D., Arasteh, J. M., Stares, M. D., Browne, H. P., et al. (2014). Epithelial IL-22RA1-Mediated Fucosylation Promotes Intestinal Colonization Resistance to an Opportunistic Pathogen. *Cell Host & Microbe* 16, 504–516. doi: 10.1016/j.chom.2014.08.017
- Pieper, R., Tudela, C. V., Taciak, M., Bindelle, J., Pérez, J. F., and Zentek, J. (2016). Health relevance of intestinal protein fermentation in young pigs. *Animal Health Research Reviews* 17, 137–147. doi: 10.1017/S1466252316000141
- Pillai, S., Netravali, I. A., Cariappa, A., and Mattoo, H. (2012). Siglecs and Immune Regulation. *Annual Review of Immunology* 30, 357–392. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075018
- Plantinga, M., de Haar, C., and Nierkens, S. (2015). “Dendritic Cells,” in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, eds. K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, et al. (Cham: Springer International Publishing), 181–196. doi: 10.1007/978-3-319-16104-4\_17
- Pluske, J. R., Pethick, D. W., Hopwood, D. E., and Hampson, D. J. (2002). Nutritional influences on some major enteric bacterial diseases of pig. *Nutrition Research Reviews* 15, 333–371. doi: 10.1079/NRR200242
- Pohl, C. S., Medland, J. E., Mackey, E., Edwards, L. L., Bagley, K. D., DeWilde, M. P., et al. (2017). Early weaning stress induces chronic functional diarrhea, intestinal barrier defects, and increased mast cell activity in a porcine model of early life adversity. *Neurogastroenterology & Motility* 29, e13118. doi: 10.1111/nmo.13118
- Porfirio, S., Archer-Hartmann, S., Moreau, G. B., Ramakrishnan, G., Haque, R., Kirkpatrick, B. D., et al. (2020). New strategies for profiling and characterization of human milk oligosaccharides. *Glycobiology* 30, 774–786. doi: 10.1093/glycob/cwaa028
- Pustejovsky, J., and Stubbs, A. (2013). *Natural language annotation for machine learning*. Sebastopol, CA: O’Reilly Media.
- Qiao, Y., Feng, J., Yang, J., and Gu, G. (2013). The Relationship between Dietary Vitamin A Intake and the Levels of Sialic Acid in the Breast Milk of Lactating Women. *Journal of nutritional science and vitaminology* 59, 347–351.

- Rabinovich, G. A., and Toscano, M. A. (2009). Turning “sweet” on immunity: galectin–glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nature Reviews Immunology* 9, 338–352. doi: 10.1038/nri2536
- Raghupathy, R. (1997). Th 1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunology Today* 18, 478–482. doi: 10.1016/S0167-5699(97)01127-4
- Ramakrishnan, B., Boeggeman, E., and Qasba, P. K. (2002). Beta-1,4-galactosyltransferase and lactose synthase: molecular mechanical devices. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291, 1113–1118. doi: 10.1006/bbrc.2002.6506
- Ranjan, R., Rani, A., Metwally, A., McGee, H. S., and Perkins, D. L. (2016). Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 469, 967–977. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.083
- Ran-Ressler, R. R., Glahn, R. P., Bae, S., and Brenna, J. T. (2013). “Branched-Chain Fatty Acids in the Neonatal Gut and Estimated Dietary Intake in Infancy and Adulthood,” in *Nestlé Nutrition Institute Workshop Series*, eds. M. Makrides, J. B. Ochoa, and H. Szajewska (S. Karger AG), 133–143. doi: 10.1159/000351396
- Rapoport, E. M., Kurmyshkina, O. V., and Bovin, N. V. (2008). Mammalian galectins: Structure, carbohydrate specificity, and functions. *Biochemistry Moscow* 73, 393–405. doi: 10.1134/S0006297908040032
- Raschke, W. C., Baird, S., Ralph, P., and Nakoinz, I. (1978). Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus. *Cell* 15, 261–267. doi: 10.1016/0092-8674(78)90101-0
- Read, T., Fortun-Lamothe, L., Pascal, G., Le Boulch, M., Cauquil, L., Gabinaud, B., et al. (2019). Diversity and Co-occurrence Pattern Analysis of Cecal Microbiota Establishment at the Onset of Solid Feeding in Young Rabbits. *Frontiers in Microbiology* 10. doi: 10.3389/fmicb.2019.00973
- Recaldin, T., Steinacher, L., Gjeta, B., Harter, M. F., Adam, L., Kromer, K., et al. (2024). Human organoids with an autologous tissue-resident immune compartment. *Nature* 633, 165–173. doi: 10.1038/s41586-024-07791-5
- Reichardt, N., Duncan, S. H., Young, P., Belenguer, A., McWilliam Leitch, C., Scott, K. P., et al. (2014). Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *The ISME Journal* 8, 1323–1335. doi: 10.1038/ismej.2014.14
- Remoroza, C. A., Liang, Y., Mak, T. D., Mirokhin, Y., Sheetlin, S. L., Yang, X., et al. (2020). Increasing the Coverage of a Mass Spectral Library of Milk Oligosaccharides Using a Hybrid-Search-Based Bootstrapping Method and Milks from a Wide Variety of Mammals. *Analytical Chemistry* 92, 10316–10326. doi: 10.1021/acs.analchem.0c00342
- Renwick, S., Furst, A., Knip, M., Bode, L., Danska, J. S., Allen-Vercoe, E., et al. (2025). Modulating the developing gut microbiota with 2'-fucosyllactose and pooled human milk oligosaccharides. *Microbiome* 13, 44. doi: 10.1186/s40168-025-02034-9

- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., et al. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology* 2, 361–367. doi: 10.1038/86373
- Reuter, G. (1985). Elective and selective media for lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 2, 55–68. doi: 10.1016/0168-1605(85)90057-1
- Rhee, K.-J., Sethupathi, P., Driks, A., Lanning, D. K., and Knight, K. L. (2004). Role of Commensal Bacteria in Development of Gut-Associated Lymphoid Tissues and Preimmune Antibody Repertoire. *The Journal of Immunology* 172, 1118–1124. doi: 10.4049/jimmunol.172.2.1118
- Rhouma, M., Fairbrother, J. M., Beaudry, F., and Letellier, A. (2017). Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Veterinaria Scandinavica* 59, 31. doi: 10.1186/s13028-017-0299-7
- Robinson, J. P., Ostafe, R., Iyengar, S. N., Rajwa, B., and Fischer, R. (2023). Flow Cytometry: The Next Revolution. *Cells* 12, 1875. doi: 10.3390/cells12141875
- Robinson, R. C., Poulsen, N. A., Colet, E., Duchene, C., Larsen, L. B., and Barile, D. (2019). Profiling of aminoxymethyl (TMT)-labeled bovine milk oligosaccharides reveals substantial variation in oligosaccharide abundance between dairy cattle breeds. *Scientific reports* 9, 5465. doi: 10.1038/s41598-019-41956-x
- Rockova, S., Rada, V., Nevoral, J., Marsik, P., Vlkova, E., and Bunesova, V. (2012). Inter-species differences in the growth of bifidobacteria cultured on human milk oligosaccharides. *Folia Microbiologica* 57, 321–324. doi: 10.1007/s12223-012-0134-5
- Roesch, L. F. W., Casella, G., Simell, O., Krischer, J., Wasserfall, C. H., Schatz, D., et al. (2009). Influence of Fecal Sample Storage on Bacterial Community Diversity. *The Open Microbiology Journal* 3. doi: 10.2174/1874285800903010040
- Rogers, T. E., Pudlo, N. A., Koropatkin, N. M., Bell, J. S. K., Moya Balasch, M., Jasker, K., et al. (2013). Dynamic responses of *Bacteroides thetaiotaomicron* during growth on glycan mixtures. *Molecular Microbiology* 88, 876–890. doi: 10.1111/mmi.12228
- Rothkötter, H. J., Ulbrich, H., and Pabst, R. (1991). The Postnatal Development of Gut Lamina Propria Lymphocytes: Number, Proliferation, and T and B Cell Subsets in Conventional and Germ-Free Pigs. *Pediatric Research* 29, 237–242. doi: 10.1203/00006450-199103000-00004
- Round, J. L., Lee, S. M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T. A., et al. (2011). The Toll-Like Receptor 2 Pathway Establishes Colonization by a Commensal of the Human Microbiota. *Science* 332, 974–977. doi: 10.1126/science.1206095
- Round, J. L., and Mazmanian, S. K. (2010). Inducible Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 12204–12209. doi: 10.1073/pnas.0909122107
- Rubic, T., Lametschwandtner, G., Jost, S., Hinteregger, S., Kund, J., Carballido-Perrig, N., et al. (2008). Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. *Nature Immunology* 9, 1261–1269. doi: 10.1038/ni.1657

- Rubio-Del-Campo, A., Alcántara, C., Collado, M. C., Rodríguez-Díaz, J., and Yebra, M. J. (2020). Human milk and mucosa-associated disaccharides impact on cultured infant fecal microbiota. *Scientific reports* 10, 11845. doi: 10.1038/s41598-020-68718-4
- Rudloff, S., Stefan, C., Pohlentz, G., and Kunz, C. (2002). Detection of ligands for selectins in the oligosaccharide fraction of human milk. *European Journal of Nutrition* 41, 85–92. doi: 10.1007/s003940200012
- Ruhaak, L., and Lebrilla, C. (2012). Advances in Analysis of Human Milk Oligosaccharides. *Advances in Nutrition* 3, 406S-414S. doi: 10.3945/an.112.001883
- Ruiz-Moyano, S., Totten, S. M., Garrido, D. A., Smilowitz, J. T., German, J. B., Lebrilla, C. B., et al. (2013). Variation in Consumption of Human Milk Oligosaccharides by Infant Gut-Associated Strains of *Bifidobacterium breve*. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 6040–6049. doi: 10.1128/AEM.01843-13
- Ruiz-Palacios, G. M., Cervantes, L. E., Ramos, P., Chavez-Munguia, B., and Newburg, D. S. (2003). *Campylobacter jejuni* Binds Intestinal H(O) Antigen (Fuc $\alpha$ 1, 2Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc), and Fucosyloligosaccharides of Human Milk Inhibit Its Binding and Infection. *Journal of Biological Chemistry* 278, 14112–14120. doi: 10.1074/jbc.M207744200
- Russel, W. M. S., and Burch, R. L. (1959). The Principles of Humane Experimental Technique. *Medical Journal of Australia* 1, 500–500. doi: 10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x
- Sadovnikova, A., Garcia, S., and Hovey, R. (2021). A Comparative Review of the Cell Biology, Biochemistry, and Genetics of Lactose Synthesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 26, 181–196. doi: 10.1007/s10911-021-09490-7
- Saeland, E., de Jong, M., Nabatov, A., Kalay, H., Geijtenbeek, T., and van Kooyk, Y. (2009). MUC1 in human milk blocks transmission of human immunodeficiency virus from dendritic cells to T cells. *Molecular Immunology* 46, 2309–2316. doi: 10.1016/j.molimm.2009.03.025
- Saito, T., Itoh, T., and Adachi, S. (1984). Presence of two neutral disaccharides containing *N*-acetylhexosamine in bovine colostrum as free forms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 801, 147–150. doi: 10.1016/0304-4165(84)90223-X
- Salak-Johnson, J. L., and McGlone, J. J. (2007). Making sense of apparently conflicting data: Stress and immunity in swine and cattle. *Journal of Animal Science* 85, E81–E88. doi: 10.2527/jas.2006-538
- Salcedo, J., Frese, S. A., Mills, D. A., and Barile, D. (2016). Characterization of porcine milk oligosaccharides during early lactation and their relation to the fecal microbiome. *Journal of dairy science* 99, 7733–7743. doi: 10.3168/jds.2016-10966
- Saleri, R., Borghetti, P., Ravanetti, F., Cavalli, V., Ferrari, L., De Angelis, E., et al. (2022). Effects of different short-chain fatty acids (SCFA) on gene expression of proteins involved in barrier function in IPEC-J2. *Porcine Health Management* 8, 21. doi: 10.1186/s40813-022-00264-z
- Salli, K., Hirvonen, J., Siitonen, J., Ahonen, I., Anglenius, H., and Maukonen, J. (2021). Selective Utilization of the Human Milk Oligosaccharides 2'-Fucosyllactose, 3-Fucosyllactose,

- and Difucosyllactose by Various Probiotic and Pathogenic Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69, 170–182. doi: 10.1021/acs.jafc.0c06041
- Salminen, S., Stahl, B., Vinderola, G., and Szajewska, H. (2020). Infant Formula Supplemented with Biotics: Current Knowledge and Future Perspectives. *Nutrients* 12, 1952. doi: 10.3390/nu12071952
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stamatii, A., and Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology* 21, 1–26. doi: 10.1007/s10565-005-0085-6
- Samuel, T. M., Binia, A., de Castro, C. A., Thakkar, S. K., Billeaud, C., Agosti, M., et al. (2019). Impact of maternal characteristics on human milk oligosaccharide composition over the first 4 months of lactation in a cohort of healthy European mothers. *Scientific reports* 9, 11767. doi: 10.1038/s41598-019-48337-4
- Schalich, K. M., Buendia, M. A., Kaur, H., Choksi, Y. A., Washington, M. K., Codreanu, G. S., et al. (2024). A human milk oligosaccharide prevents intestinal inflammation in adulthood via modulating gut microbial metabolism. *mBio* 15, e00298-24. doi: 10.1128/mbio.00298-24
- Schamberger, G. P., and Diez-Gonzalez, F. (2002). Selection of Recently Isolated Colicinogenic *Escherichia coli* Strains Inhibitory to *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection* 65, 1381–1387. doi: 10.4315/0362-028X-65.9.1381
- Schokker, D., Fledderus, J., Jansen, R., Vastenhouw, S. A., de Bree, F. M., Smits, M. A., et al. (2018). Supplementation of fructooligosaccharides to suckling piglets affects intestinal microbiota colonization and immune development<sup>1</sup>. *Journal of Animal Science* 96, 2139–2153. doi: 10.1093/jas/sky110
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., and Johne, R. (2012). PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* 113, 1014–1026. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x
- Schreurs, R. R. C. E., Baumdick, M. E., Drewniak, A., and Bunders, M. J. (2021). In vitro co-culture of human intestinal organoids and lamina propria-derived CD4<sup>+</sup> T cells. *STAR Protocols* 2, 100519. doi: 10.1016/j.xpro.2021.100519
- Schrezenmeir, J., and de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition<sup>123</sup>. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73, 361s–364s. doi: 10.1093/ajcn/73.2.361s
- Schwab, C., and Gänzle, M. (2011). Lactic acid bacteria fermentation of human milk oligosaccharide components, human milk oligosaccharides and galactooligosaccharides: LAB fermentation of HMOs and GOSs. *FEMS Microbiology Letters* 315, 141–148. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02185.x
- Schwab, C., Ruscheweyh, H.-J., Bunesova, V., Pham, V. T., Beerenwinkel, N., and Lacroix, C. (2017). Trophic Interactions of Infant Bifidobacteria and *Eubacterium hallii* during L-Fucose and Fucosyllactose Degradation. *Frontiers in Microbiology* 8, 95. doi: 10.3389/fmicb.2017.00095

- Seeberger, P. H. (2022). "Monosaccharide Diversity," in *Essentials of Glycobiology*, eds. A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, et al. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Seferovic, M. D., Mohammad, M., Pace, R. M., Engevik, M., Versalovic, J., Bode, L., et al. (2020). Maternal diet alters human milk oligosaccharide composition with implications for the milk metagenome. *Scientific reports* 10, 22092. doi: 10.1038/s41598-020-79022-6
- Sela, D. A., Garrido, D., Lerno, L., Wu, S., Tan, K., Eom, H.-J., et al. (2012). Bifidobacterium longum subsp. infantis ATCC 15697  $\alpha$ -Fucosidases Are Active on Fucosylated Human Milk Oligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 795–803. doi: 10.1128/AEM.06762-11
- Sela, D., Li, Y., Lerno, L., Wu, S., Marcobal, A., German, J., et al. (2011). An Infant-associated Bacterial Commensal Utilizes Breast Milk Sialyloligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry* 286. doi: 10.1074/jbc.M110.193359
- Selma-Royo, M., Gonzalez, S., Gueimonde, M., Chang, M., Furst, A., Martinez-Costa, C., et al. (2022). Maternal Diet Is Associated with Human Milk Oligosaccharide Profile. *Molecular Nutrition & Food Research* 66. doi: 10.1002/mnfr.202200058
- Senda, A., Hatakeyama, E., Kobayashi, R., Fukuda, K., Uemura, Y., Saito, T., et al. (2010). Chemical characterization of milk oligosaccharides of an African lion (*Panthera leo*) and a clouded leopard (*Neofelis nebulosa*). *Animal science journal* 81, 687–693. doi: 10.1111/j.1740-0929.2010.00787.x
- Shad, D. M. B. (1963). The Composition of the Milk of Wild Animals. *International Zoo Yearbook* 4, 333–333. doi: 10.1111/j.1748-1090.1963.tb03691.x
- Shams-Ud-Doha, K., Kitova, E. N., Kitov, P. I., St-Pierre, Y., and Klassen, J. S. (2017). Human Milk Oligosaccharide Specificities of Human Galectins. Comparison of Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Glycan Microarray Screening Results. *Analytical Chemistry* 89, 4914–4921. doi: 10.1021/acs.analchem.6b05169
- Shani, G., Hoeflinger, J., Heiss, B., Masarweh, C., Larke, J., Jensen, N., et al. (2022). Fucosylated Human Milk Oligosaccharide Foraging within the Species Bifidobacterium pseudocatenulatum Is Driven by Glycosyl Hydrolase Content and Specificity. *Applied and Environmental Microbiology* 88. doi: 10.1128/AEM.01707-21
- Shi, Y., Han, B., Zhang, L., and Zhou, P. (2021). Comprehensive Identification and Absolute Quantification of Milk Oligosaccharides in Different Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69, 15585–15597. doi: 10.1021/acs.jafc.1c05872
- Shin, R., Suzuki, M., and Morishita, Y. (2002). Influence of intestinal anaerobes and organic acids on the growth of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *Journal of Medical Microbiology* 51, 201–206. doi: 10.1099/0022-1317-51-3-201
- Simon, P. M., Goode, P. L., Mobasser, A., and Zopf, D. (1997). Inhibition of Helicobacter pylori binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic acid-containing oligosaccharides. *Infection and Immunity* 65, 750–757. doi: 10.1128/iai.65.2.750-757.1997

- Singh, N., Thangaraju, M., Prasad, P. D., Martin, P. M., Lambert, N. A., Boettger, T., et al. (2010). Blockade of Dendritic Cell Development by Bacterial Fermentation Products Butyrate and Propionate through a Transporter (Slc5a8)-dependent Inhibition of Histone Deacetylases. *Journal of Biological Chemistry* 285, 27601–27608. doi: 10.1074/jbc.M110.102947
- Singh, R. P., Niharika, J., Kondepudi, K. K., Bishnoi, M., and Tingirikari, J. M. R. (2022). Recent understanding of human milk oligosaccharides in establishing infant gut microbiome and roles in immune system. *Food Research International* 151, 110884. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110884
- Šinkora, M., and Butler, J. E. (2009). The ontogeny of the porcine immune system. *Developmental & Comparative Immunology* 33, 273–283. doi: 10.1016/j.dci.2008.07.011
- Sinkora, M., and Sinkorova, J. (2014). B Cell Lymphogenesis in Swine Is Located in the Bone Marrow. *The Journal of Immunology* 193, 5023–5032. doi: 10.4049/jimmunol.1401152
- Skibieli, A. L., Downing, L. M., Orr, T. J., and Hood, W. R. (2013). The evolution of the nutrient composition of mammalian milks. *Journal of Animal Ecology* 82, 1254–1264. doi: 10.1111/1365-2656.12095
- Smilowitz, J. T., Lebrilla, C. B., Mills, D. A., German, J. B., and Freeman, S. L. (2014). Breast Milk Oligosaccharides: Structure-Function Relationships in the Neonate. *Annual Review of Nutrition* 34, 143–169. doi: 10.1146/annurev-nutr-071813-105721
- Smith, D., and Cummings, R. (2017). “Analytical Methods to Characterize Human Milk Oligosaccharides,” in *Prebiotics and Probiotics in Human Milk: Origins and Functions of Milk-Borne Oligosaccharides and Bacteria*, 141–168. doi: 10.1016/B978-0-12-802725-7.00004-X
- Smith, P. M., and Garrett, W. S. (2011). The Gut Microbiota and Mucosal T Cells. *Frontiers in Microbiology* 2. doi: 10.3389/fmicb.2011.00111
- Sodhi, C. P., Wipf, P., Yamaguchi, Y., Fulton, W. B., Kovler, M., Niño, D. F., et al. (2021). The human milk oligosaccharides 2'-fucosyllactose and 6'-sialyllactose protect against the development of necrotizing enterocolitis by inhibiting toll-like receptor 4 signaling. *Pediatric research* 89, 91–101. doi: 10.1038/s41390-020-0852-3
- Song, H. S., Kim, Y. B., Kim, J. Y., Roh, S. W., and Whon, T. W. (2024). Advances in Culturomics Research on the Human Gut Microbiome: Optimizing Medium Composition and Culture Techniques for Enhanced Microbial Discovery. *Journal of microbiology and biotechnology* 34, 757–764. doi: 10.4014/jmb.2311.11024
- Sotgiu, S., Arru, G., Fois, M. L., Sanna, A., Musumeci, M., Rosati, G., et al. (2006). Immunomodulation of fucosyl-lactose and lacto-N-fucopentaose on mononuclear cells from multiple sclerosis and healthy subjects. *International journal of biomedical science: IJBS* 2, 114–120.
- Speers, A. M., Cologgi, D. L., and Reguera, G. (2009). Anaerobic Cell Culture. *Current Protocols in Microbiology* 12. doi: 10.1002/9780471729259.mca04fs12

- Spichtig, V., Michaud, J., and Austin, S. (2010). Determination of sialic acids in milks and milk-based products. *Analytical Biochemistry* 405, 28–40. doi: 10.1016/j.ab.2010.06.010
- Sprenger, N., Tytgat, H. L. P., Binia, A., Austin, S., and Singhal, A. (2022). Biology of human milk oligosaccharides: From basic science to clinical evidence. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 35, 280–299. doi: 10.1111/jhn.12990
- Štěpánková, R., Kovářů, F., and Kruml, J. (1980). Lymphatic tissue of the intestinal tract of germfree and conventional rabbits. *Folia Microbiologica* 25, 491. doi: 10.1007/BF02897215
- Stewart, E. J. (2012). Growing Unculturable Bacteria. *Journal of Bacteriology* 194, 4151–4160. doi: 10.1128/jb.00345-12
- Stokes, C. R., Bailey, M., Haverson, K., Harris, C., Jones, P., Inman, C., et al. (2004). Postnatal development of intestinal immune system in piglets: implications for the process of weaning. *Animal Research* 53, 325–334. doi: 10.1051/animres:2004020
- Strecker, G., Fievre, S., Wieruszkeski, J., Michalski, J., and Montreuil, J. (1992). Primary structure of 4 human-milk octa-saccharides, nona-saccharides, and undeca-saccharides established by h-1-nuclear and c-13-nuclear magnetic-resonance spectroscopy. *Carbohydrate Research* 226, 1–14. doi: 10.1016/0008-6215(92)84050-3
- Sulabo, R. C., Tokach, M. D., Dritz, S. S., Goodband, R. D., DeRouchey, J. M., and Nelssen, J. L. (2010). Effects of varying creep feeding duration on the proportion of pigs consuming creep feed and neonatal pig performance<sup>1</sup>. *Journal of Animal Science* 88, 3154–3162. doi: 10.2527/jas.2009-2134
- Šuligoj, T., Vignæs, L. K., Abbeele, P. V. den, Apostolou, A., Karalis, K., Savva, G. M., et al. (2020). Effects of Human Milk Oligosaccharides on the Adult Gut Microbiota and Barrier Function. *Nutrients* 12, 2808. doi: 10.3390/nu12092808
- Sun, W., Tao, L., Qian, C., Xue, P., Du, S., and Tao, Y. (2025). Human milk oligosaccharides: bridging the gap in intestinal microbiota between mothers and infants. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 14. doi: 10.3389/fcimb.2024.1386421
- Sundekilde, U., Barile, D., Meyrand, M., Poulsen, N., Larsen, L., Lebrila, C., et al. (2012). Natural Variability in Bovine Milk Oligosaccharides from Danish Jersey and Holstein-Friesian Breeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 6188–6196. doi: 10.1021/jf300015j
- Sundström, C., and Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *International Journal of Cancer* 17, 565–577. doi: 10.1002/ijc.2910170504
- Tachibana, Y., Yamashita, K., and Kobata, A. (1978). Oligosaccharides of human milk: structural studies of di- and trifucosyl derivatives of lacto-N-octose and lacto-N-neo-octose. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 188, 83–89. doi: 10.1016/0003-9861(78)90359-4
- Tailford, L. E., Crost, E. H., Kavanaugh, D., and Juge, N. (2015). Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Frontiers in Genetics* 6. doi: 10.3389/fgene.2015.00081

- Takiishi, T., Fenero, C. I. M., and Câmara, N. O. S. (2017). Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers* 5, e1373208. doi: 10.1080/21688370.2017.1373208
- Tally, F. P., Stewart, P. R., Sutter, V. L., and Rosenblatt, J. E. (1975). Oxygen tolerance of fresh clinical anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 1, 161–164. doi: 10.1128/jcm.1.2.161-164.1975
- Tan, M., and Jiang, X. (2011). Norovirus–host interaction: Multi-selections by human histo-blood group antigens. *Trends in Microbiology* 19, 382–388. doi: 10.1016/j.tim.2011.05.007
- Tang, J., Yao, D., Zhao, J., and Tu, M. (2025). Inflammatory modulation effects of human milk oligosaccharides: From screening *in-vitro* to application in the milk powders. *Food Bioscience* 65, 106111. doi: 10.1016/j.fbio.2025.106111
- Tang, Q., Lan, T., Zhou, C., Gao, J., Wu, L., Wei, H., et al. (2024). Nutrition strategies to control post-weaning diarrhea of piglets: From the perspective of feeds. *Animal Nutrition* 17, 297–311. doi: 10.1016/j.aninu.2024.03.006
- Tao, N., DePeters, E., German, J., Grimm, R., and Lebrilla, C. (2009). Variations in bovine milk oligosaccharides during early and middle lactation stages analyzed by high-performance liquid chromatography-chip/mass spectrometry. *Journal of Dairy Science* 92, 2991–3001. doi: 10.3168/jds.2008-1642
- Tao, N., Wu, S., Kim, J., An, H., Hinde, K., Power, M., et al. (2011). Evolutionary Glycomics: Characterization of Milk Oligosaccharides in Primates. *Journal of Proteome Research* 10, 1548–1557. doi: 10.1021/pr1009367
- Tate, J. E., Burton, A. H., Boschi-Pinto, C., Parashar, U. D., for the World Health Organization–Coordinated Global Rotavirus Surveillance Network, Agocs, M., et al. (2016). Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000–2013. *Clinical Infectious Diseases* 62, S96–S105. doi: 10.1093/cid/civ1013
- Taufik, E., Fukuda, K., Senda, A., Saito, T., Williams, C., Tilden, C., et al. (2012). Structural characterization of neutral and acidic oligosaccharides in the milks of strepsirrhine primates: greater galago, aye-aye, Coquerel’s sifaka and mongoose lemur. *Glycoconjugate Journal* 29, 119–134. doi: 10.1007/s10719-012-9370-9
- Thiagarajah, J. R., Donowitz, M., and Verkman, A. S. (2015). Secretory diarrhoea: mechanisms and emerging therapies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12, 446–457. doi: 10.1038/nrgastro.2015.111
- Thomas, P. G., Carter, M. R., Atochina, O., Da’Dara, A. A., Piskorska, D., McGuire, E., et al. (2003). Maturation of Dendritic Cell 2 Phenotype by a Helminth Glycan Uses a Toll-Like Receptor 4-Dependent Mechanism. *The Journal of Immunology* 171, 5837–5841. doi: 10.4049/jimmunol.171.11.5837
- Thompson, C. L., Wang, B., and Holmes, A. J. (2008). The immediate environment during postnatal development has long-term impact on gut community structure in pigs. *The ISME Journal* 2, 739–748. doi: 10.1038/ismej.2008.29

- Thongaram, T., Hoeflinger, J., Chow, J., and Miller, M. (2017). Human milk oligosaccharide consumption by probiotic and human-associated bifidobacteria and lactobacilli. *Journal of dairy science* 100, 7825–7833. doi: 10.3168/jds.2017-12753
- Thum, C., Cookson, A., McNabb, W. C., Roy, N. C., and Otter, D. (2015a). Composition and enrichment of caprine milk oligosaccharides from New Zealand Saanen goat cheese whey. *Journal of Food Composition and Analysis* 42, 30–37. doi: 10.1016/j.jfca.2015.01.022
- Thum, C., Roy, N. C., McNabb, W. C., Otter, D. E., and Cookson, A. L. (2015b). In Vitro Fermentation of caprine milk oligosaccharides by bifidobacteria isolated from breast-fed infants. *Gut Microbes* 6, 352–363. doi: 10.1080/19490976.2015.1105425
- Thurl, S., Henker, J., Siegel, M., Tovar, K., and Sawatzki, G. (1997). Detection of four human milk groups with respect to Lewis blood group dependent oligosaccharides. *Glycoconjugate Journal* 14, 795–799. doi: 10.1023/A:1018529703106
- Thurl, S., MullerWerner, B., and Sawatzki, G. (1996). Quantification of individual oligosaccharide compounds from human milk using high-pH anion-exchange chromatography. *Analytical Biochemistry* 235, 202–206. doi: 10.1006/abio.1996.0113
- Thurl, S., Munzert, M., Boehm, G., Matthews, C., and Stahl, B. (2017). Systematic review of the concentrations of oligosaccharides in human milk. *Nutrition Reviews* 75, 920–933. doi: 10.1093/nutrit/nux044
- Thurl, S., Munzert, M., Henker, J., Boehm, G., Muller-Werner, B., Jelinek, J., et al. (2010). Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. *British Journal of Nutrition* 104, 1261–1271. doi: 10.1017/S0007114510002072
- Tian, S., Wang, J., Yu, H., Wang, J., and Zhu, W. (2018). Effects of galacto-oligosaccharides on growth and gut function of newborn suckling piglets. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 9, 75. doi: 10.1186/s40104-018-0290-9
- Tizard, I. R. (2023). “Chapter 2 - The evolution of viviparity,” in *Comparative Mammalian Immunology*, ed. I. R. Tizard (Academic Press), 15–28. doi: 10.1016/B978-0-323-95219-4.00018-6
- Torow, N., and Hornef, M. W. (2017). The Neonatal Window of Opportunity: Setting the Stage for Life-Long Host-Microbial Interaction and Immune Homeostasis. *The Journal of Immunology* 198, 557–563. doi: 10.4049/jimmunol.1601253
- Torow, N., Yu, K., Hassani, K., Freitag, J., Schulz, O., Basic, M., et al. (2015). Active suppression of intestinal CD4+TCRαβ+ T-lymphocyte maturation during the postnatal period. *Nature Communications* 6, 7725. doi: 10.1038/ncomms8725
- Totten, S., Zivkovic, A., Wu, S., Ngyuen, U., Freeman, S., Ruhaak, L., et al. (2012). Comprehensive Profiles of Human Milk Oligosaccharides Yield Highly Sensitive and Specific Markers for Determining Secretor Status in Lactating Mothers. *Journal of Proteome Research* 11, 6124–6133. doi: 10.1021/pr300769g

- Tramontano, M., Andrejev, S., Pruteanu, M., Klünemann, M., Kuhn, M., Galardini, M., et al. (2018). Nutritional preferences of human gut bacteria reveal their metabolic idiosyncrasies. *Nature Microbiology* 3, 514–522. doi: 10.1038/s41564-018-0123-9
- Trevisi, P., Luise, D., Won, S., Salcedo, J., Bertocchi, M., Barile, D., et al. (2020). Variations in porcine colostrum oligosaccharide composition between breeds and in association with sow maternal performance. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 11. doi: 10.1186/s40104-020-0430-x
- Triantis, V., Bode, L., and van Neerven, R. J. J. (2018). Immunological Effects of Human Milk Oligosaccharides. *Frontiers in Pediatrics* 6, 190. doi: 10.3389/fped.2018.00190
- Truneh, A., Albert, F., Golstein, P., and Schmitt-Verhulst, A.-M. (1985). Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester. *Nature* 313, 318–320. doi: 10.1038/313318a0
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., and Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International Journal of Cancer* 26, 171–176. doi: 10.1002/ijc.2910260208
- Tuncil, Y. E., Xiao, Y., Porter, N. T., Reuhs, B. L., Martens, E. C., and Hamaker, B. R. (2017). Reciprocal Prioritization to Dietary Glycans by Gut Bacteria in a Competitive Environment Promotes Stable Coexistence. *mBio* 8, 10.1128/mbio.01068-17. doi: 10.1128/mbio.01068-17
- Turrone, F., Bottacini, F., Foroni, E., Mulder, I., Kim, J.-H., Zomer, A., et al. (2010). Genome analysis of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 reveals metabolic pathways for host-derived glycan foraging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 19514–19519. doi: 10.1073/pnas.1011100107
- Uemura, Y., Asakuma, S., Nakamura, T., Arai, I., Taki, M., and Urashima, T. (2005). Occurrence of a unique sialyl tetrasaccharide in colostrum of a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Biochimica Et Biophysica Acta* 1725, 290–297. doi: 10.1016/j.bbagen.2005.05.011
- Uemura, Y., Takahashi, S., Senda, A., Fukuda, K., Saito, T., Oftedal, O., et al. (2009). Chemical characterization of milk oligosaccharides of a spotted hyena (*Crocuta crocuta*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 152, 158–161. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.09.013
- Urashima, T., Ajisaka, K., Ujihara, T., and Nakazaki, E. (2025). Recent advances in the science of human milk oligosaccharides. *BBA Advances* 7, 100136. doi: 10.1016/j.bbadv.2024.100136
- Urashima, T., Hirabayashi, J., Sato, S., and Kobata, A. (2018). Human Milk Oligosaccharides as Essential Tools for Basic and Application Studies on Galectins. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 30, SE51–SE65. doi: 10.4052/tigg.1734.1SE
- Urashima, T., Kitaoka, M., Asakuma, S., and Messer, M. (2009a). “Milk Oligosaccharides,” in *Advanced Dairy Chemistry: Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents*, eds. P. McSweeney and P. F. Fox (New York, NY: Springer), 295–349. doi: 10.1007/978-0-387-84865-5\_8

- Urashima, T., Messer, M., and Oftedal, O. T. (2014). "Comparative Biochemistry and Evolution of Milk Oligosaccharides of Monotremes, Marsupials, and Eutherians," in *Evolutionary Biology: Genome Evolution, Speciation, Coevolution and Origin of Life*, ed. P. Pontarotti (Cham: Springer International Publishing), 3–33. doi: 10.1007/978-3-319-07623-2\_1
- Urashima, T., Odaka, G., Asakuma, S., Uemura, Y., Goto, K., Senda, A., et al. (2009b). Chemical characterization of oligosaccharides in chimpanzee, bonobo, gorilla, orangutan, and siamang milk or colostrum. *Glycobiology* 19, 499–508. doi: 10.1093/glycob/cwp006
- Urashima, T., Saito, T., Nakamura, T., and Messer, M. (2001). Oligosaccharides of milk and colostrum in non-human mammals. *Glycoconjugate Journal* 18, 357–371. doi: 10.1023/A:1014881913541
- Urashima, T., Taufik, E., Fukuda, K., and Asakuma, S. (2013). Recent advances in studies on milk oligosaccharides of cows and other domestic farm animals. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 77, 455–466. doi: 10.1271/bbb.120810
- Urashima, T., Umewaki, M., Taufik, E., Ohshima, T., Fukuda, K., Saito, T., et al. (2020). Chemical structures of oligosaccharides in milks of the American black bear (*Ursus americanus americanus*) and cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Glycoconjugate journal* 37, 57–76. doi: 10.1007/s10719-019-09899-7
- Urrutia-Baca, V. H., Gutiérrez-Urbe, J. A., Ramos-Parra, P. A., Domínguez-Uscanga, A., Rodríguez-Gutiérrez, N. A., Chavez-Caraza, K. L., et al. (2024). Exploring the impact of maternal factors and dietary habits on human milk oligosaccharide composition in early breastfeeding among Mexican women. *Scientific Reports* 14, 14685. doi: 10.1038/s41598-024-63787-1
- Valeriano, V. D. V., Balolong, M. P., and Kang, D.-K. (2017). Probiotic roles of *Lactobacillus* sp. in swine: insights from gut microbiota. *Journal of Applied Microbiology* 122, 554–567. doi: 10.1111/jam.13364
- Valguarnera, E., and Wardenburg, J. B. (2020). Good Gone Bad: One Toxin Away From Disease for *Bacteroides fragilis*. *Journal of Molecular Biology* 432, 765–785. doi: 10.1016/j.jmb.2019.12.003
- van Kooyk, Y., and Rabinovich, G. A. (2008). Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nature Immunology* 9, 593–601. doi: 10.1038/ni.f.203
- van Leeuwen, S. S. (2019). Challenges and Pitfalls in Human Milk Oligosaccharide Analysis. *Nutrients* 11, 2684. doi: 10.3390/nu11112684
- van Leeuwen, S. S., Stoutjesdijk, E., ten Kate, G. A., Schaafsma, A., Dijck-Brouwer, J., Muskiet, F. A. J., et al. (2018). Regional variations in human milk oligosaccharides in Vietnam suggest FucTx activity besides FucT2 and FucT3. *Scientific Reports* 8, 16790. doi: 10.1038/s41598-018-34882-x
- van Liempt, E., Bank, C. M. C., Mehta, P., García-Vallejo, J. J., Kawar, Z. S., Geyer, R., et al. (2006). Specificity of DC-SIGN for mannose- and fucose-containing glycans. *FEBS Letters* 580, 6123–6131. doi: 10.1016/j.febslet.2006.10.009

- van Winkelhoff, A. J., and de Graaff, J. (1983). Vancomycin as a selective agent for isolation of *Bacteroides* species. *Journal of Clinical Microbiology* 18, 1282–1284. doi: 10.1128/jcm.18.5.1282-1284.1983
- Vancamelbeke, M., and Vermeire, S. (2017). The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 11, 821–834. doi: 10.1080/17474124.2017.1343143
- Vandenplas, Y. (2002). Oligosaccharides in infant formula. *British Journal of Nutrition* 87, S293–S296. doi: 10.1079/BJN/2002551
- Varki, A., Cummings, R. D., Aebi, M., Packer, N. H., Seeberger, P. H., Esko, J. D., et al. (2015). Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans. *Glycobiology* 25, 1323–1324. doi: 10.1093/glycob/cwv091
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., and Marth, J. (1999). “Glycosyltransferases,” in *Essentials of Glycobiology*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Varki, A., and Kornfeld, S. (2022). “Historical Background and Overview,” in *Essentials of Glycobiology*, eds. A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, et al. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Vazquez, E., Santos-Fandila, A., Buck, R., Rueda, R., and Ramirez, M. (2017). Major human milk oligosaccharides are absorbed into the systemic circulation after oral administration in rats. *The British journal of nutrition* 117, 237–247. doi: 10.1017/S0007114516004554
- Vega-López, M. A., Bailey, M., Telemo, E., and Stokes, C. R. (1995). Effect of early weaning on the development of immune cells in the pig small intestine. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 44, 319–327. doi: 10.1016/0165-2427(94)05309-G
- Velupillai, P., and Harn, D. A. (1994). Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 18–22. doi: 10.1073/pnas.91.1.18
- Verma, A., Verma, M., and Singh, A. (2020). “Animal tissue culture principles and applications,” in *Animal Biotechnology (Second Edition)*, eds. A. S. Verma and A. Singh (Boston: Academic Press), 269–293. doi: 10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4
- Viggiano, D., Ianiro, G., Vanella, G., Bibbò, S., Bruno, G., Simeone, G., et al. (2015). Gut barrier in health and disease: focus on childhood. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 19, 1077–1085.
- Vinjamuri, A., Davis, J. C. C., Totten, S. M., Wu, L. D., Klein, L. D., Martin, M., et al. (2022). Human Milk Oligosaccharide Compositions Illustrate Global Variations in Early Nutrition. *The Journal of nutrition* 152, 1239–1253. doi: 10.1093/jn/nxac027
- Wagner, C., Torow, N., Hornef, M. W., and Lelouard, H. (2022). Spatial and temporal key steps in early-life intestinal immune system development and education. *The FEBS Journal* 289, 4731–4757. doi: 10.1111/febs.16047

- Walsh, C., Lane, J. A., van Sinderen, D., and Hickey, R. M. (2024). Tailored Combinations of Human Milk Oligosaccharides Modulate the Immune Response in an In Vitro Model of Intestinal Inflammation. *Biomolecules* 14, 1481. doi: 10.3390/biom14121481
- Wang, J., Lei, B., Yan, J., Li, J., Zhou, X., Ren, F., et al. (2019a). Donkey milk oligosaccharides influence the growth-related characteristics of intestinal cells and induce G2/M growth arrest via the p38 pathway in HT-29 cells. *Food & function* 10, 4823–4833. doi: 10.1039/c8fo02584c
- Wang, J., Zeng, L., Tan, B., Li, G., Huang, B., Xiong, X., et al. (2016). Developmental changes in intercellular junctions and Kv channels in the intestine of piglets during the suckling and post-weaning periods. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 7, 4. doi: 10.1186/s40104-016-0063-2
- Wang, M., Monaco, M. H., Daniels, V. C., Hirvonen, J., Jensen, H. M., Ouweland, A. C., et al. (2025). Individual and Combined Effects of 2'-Fucosyllactose and *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* on the Gut Microbiota Composition of Piglets. *The Journal of Nutrition* 155, 509–522. doi: 10.1016/j.tjnut.2024.12.022
- Wang, M., Monaco, M., Hauser, J., Yan, J., Dilger, R., and Donovan, S. (2021a). Bovine Milk Oligosaccharides and Human Milk Oligosaccharides Modulate the Gut Microbiota Composition and Volatile Fatty Acid Concentrations in a Preclinical Neonatal Model. *Microorganisms* 9. doi: 10.3390/microorganisms9050884
- Wang, W., Hu, H., Zijlstra, R., Zheng, J., and Ganzle, M. (2019b). Metagenomic reconstructions of gut microbial metabolism in weanling pigs. *Microbiome* 7. doi: 10.1186/s40168-019-0662-1
- Wang, X., Howe, S., Wei, X., Deng, F., Tsai, T., Chai, J., et al. (2021b). Comprehensive Cultivation of the Swine Gut Microbiome Reveals High Bacterial Diversity and Guides Bacterial Isolation in Pigs. *mSystems* 6, 10.1128/msystems.00477-21. doi: 10.1128/msystems.00477-21
- Wang, Y., Zou, Y., Wang, J., Ma, H., Zhang, B., and Wang, S. (2020). The Protective Effects of 2'-Fucosyllactose Against E. ColiO157 Infection Are Mediated by the Regulation of Gut Microbiota and the Inhibition of Pathogen Adhesion. *Nutrients* 12. doi: 10.3390/nu12051284
- Ward, R. E., Niñonuevo, M., Mills, D. A., Lebrilla, C. B., and German, J. B. (2006). In Vitro Fermentation of Breast Milk Oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 4497–4499. doi: 10.1128/AEM.02515-05
- Ward, R. E., Niñonuevo, M., Mills, D. A., Lebrilla, C. B., and German, J. B. (2007). In vitro fermentability of human milk oligosaccharides by several strains of bifidobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research* 51, 1398–1405. doi: 10.1002/mnfr.200700150
- Warren, C. D., Chaturvedi, P., Newburg, A. R., Oftedal, O. T., Tilden, C. D., and Newburg, D. S. (2001). Comparison of oligosaccharides in milk specimens from humans and twelve other species. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 501, 325–332. doi: 10.1007/978-1-4615-1371-1\_40

- Wei, J., Wang, Z. A., Wang, B., Jahan, M., Wang, Z., Wynn, P. C., et al. (2018). Characterization of porcine milk oligosaccharides over lactation between primiparous and multiparous female pigs. *Scientific Reports* 8, 4688. doi: 10.1038/s41598-018-23025-x
- Weichert, S., Jennewein, S., Hübner, E., Weiss, C., Borkowski, J., Putze, J., et al. (2013). Bioengineered 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose inhibit the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and enteric pathogens to human intestinal and respiratory cell lines. *Nutrition Research* 33, 831–838. doi: 10.1016/j.nutres.2013.07.009
- Weichert, S., Koromyslova, A., Singh, B. K., Hansman, S., Jennewein, S., Schroten, H., et al. (2016). Structural Basis for Norovirus Inhibition by Human Milk Oligosaccharides. *Journal of virology* 90, 4843–4848. doi: 10.1128/JVI.03223-15
- Weigmann, B., Tubbe, I., Seidel, D., Nicolaev, A., Becker, C., and Neurath, M. F. (2007). Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. *Nature Protocols* 2, 2307–2311. doi: 10.1038/nprot.2007.315
- Weinstein, P. D., Anderson, A. O., and Maget, R. G. (1994). Rabbit IgH sequences in appendix germinal centers: VH diversification by gene conversion-like and hypermutation mechanisms. *Immunity* 1, 647–659. doi: 10.1016/1074-7613(94)90036-1
- Weng, W.-C., Liao, H.-E., Huang, S.-P., Tsai, S.-T., Hsu, H.-C., Liew, C. Y., et al. (2022). Unusual free oligosaccharides in human bovine and caprine milk. *Scientific Reports* 12, 10790. doi: 10.1038/s41598-022-15140-7
- Weström, B., Arévalo Sureda, E., Pierzynowska, K., Pierzynowski, S. G., and Pérez-Cano, F.-J. (2020). The Immature Gut Barrier and Its Importance in Establishing Immunity in Newborn Mammals. *Frontiers in Immunology* 11, 1153. doi: 10.3389/fimmu.2020.01153
- Williams, J. E., McGuire, M. K., Meehan, C. L., McGuire, M. A., Brooker, S. L., Kamau-Mbuthia, E. W., et al. (2021). Key genetic variants associated with variation of milk oligosaccharides from diverse human populations. *Genomics* 113, 1867–1875. doi: 10.1016/j.ygeno.2021.04.004
- Wise, A., Robertson, B., Choudhury, B., Rautava, S., Isolauri, E., Salminen, S., et al. (2018). Infants Are Exposed to Human Milk Oligosaccharides Already in utero. *Front. Pediatr.* 6. doi: 10.3389/fped.2018.00270
- Wittig, B., and Zeitz, M. (2003). The gut as an organ of immunology. *International Journal of Colorectal Disease* 18, 181–187. doi: 10.1007/s00384-002-0444-1
- World Health Organization (2022). *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2022.*, 1st ed. Geneva: World Health Organization.
- Wrigglesworth, D. J., Goonatilleke, E., Haydock, R., Hughes, K. R., Lebrilla, C. B., Swanson, K. S., et al. (2020). High-throughput glycomic analyses reveal unique oligosaccharide profiles of canine and feline milk samples. *PLoS One* 15, e0243323. doi: 10.1371/journal.pone.0243323
- Wrzosek, L., Miquel, S., Noordine, M.-L., Bouet, S., Chevalier-Curt, M. J., Robert, V., et al. (2013). *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the

- production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biology* 11, 61. doi: 10.1186/1741-7007-11-61
- Wu, J., Zhou, Z., Hu, Y., and Dong, S. (2012). Butyrate-induced GPR41 Activation Inhibits Histone Acetylation and Cell Growth. *Journal of Genetics and Genomics* 39, 375–384. doi: 10.1016/j.jgg.2012.05.008
- Wu, R. Y., Li, B., Koike, Y., Määttänen, P., Miyake, H., Cadete, M., et al. (2019a). Human Milk Oligosaccharides Increase Mucin Expression in Experimental Necrotizing Enterocolitis. *Molecular Nutrition & Food Research* 63, 1800658. doi: 10.1002/mnfr.201800658
- Wu, R. Y., Li, B., Koike, Y., Määttänen, P., Miyake, H., Cadete, M., et al. (2019b). Human Milk Oligosaccharides Increase Mucin Expression in Experimental Necrotizing Enterocolitis. *Molecular Nutrition Food Res* 63, 1800658. doi: 10.1002/mnfr.201800658
- Wu, S., Tao, N., German, J. B., Grimm, R., and Lebrilla, C. B. (2010). Development of an Annotated Library of Neutral Human Milk Oligosaccharides. *Journal of Proteome Research* 9, 4138–4151. doi: 10.1021/pr100362f
- Wylensek, D., Hitch, T. C. A., Riedel, T., Afrizal, A., Kumar, N., Wortmann, E., et al. (2020). A collection of bacterial isolates from the pig intestine reveals functional and taxonomic diversity. *Nature Communications* 11, 6389. doi: 10.1038/s41467-020-19929-w
- Xiao, L., Leusink-Muis, T., Kettelarij, N., van Ark, I., Blijenberg, B., Heslen, N. A., et al. (2018a). Human Milk Oligosaccharide 2'-Fucosyllactose Improves Innate and Adaptive Immunity in an Influenza-Specific Murine Vaccination Model. *Frontiers in Immunology* 9, 452. doi: 10.3389/fimmu.2018.00452
- Xiao, L., van De Worp, W. R., Stassen, R., van Maastricht, C., Kettelarij, N., Stahl, B., et al. (2019). Human milk oligosaccharides promote immune tolerance via direct interactions with human dendritic cells. *European Journal of Immunology* 49, 1001–1014. doi: 10.1002/eji.201847971
- Xiao, L., van't Land, B., Engen, P., Naqib, A., Green, S., Nato, A., et al. (2018b). Human milk oligosaccharides protect against the development of autoimmune diabetes in NOD-mice. *Scientific Reports* 8. doi: 10.1038/s41598-018-22052-y
- Xie, W., Li, W., Gao, F., and Li, T. (2023). In vitro digestion and fermentation of lacto-N-biose, a core building block of human milk oligosaccharides. *International Journal of Food Science and Technology* 58, 4511–4518. doi: 10.1111/ijfs.16337
- Xin, J., Zeng, D., Wang, H., Sun, N., Zhao, Y., Dan, Y., et al. (2020). Probiotic *Lactobacillus johnsonii* BS15 Promotes Growth Performance, Intestinal Immunity, and Gut Microbiota in Piglets. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 12, 184–193. doi: 10.1007/s12602-018-9511-y
- Xu, J., Bjursell, M. K., Himrod, J., Deng, S., Carmichael, L. K., Chiang, H. C., et al. (2003). A Genomic View of the Human- *Bacteroides thetaiotaomicron* Symbiosis. *Science* 299, 2074–2076. doi: 10.1126/science.1080029

- Yamashita, K., Tachibana, Y., and Kobata, A. (1977). Oligosaccharides of human milk. Structural studies of two new octasaccharides, difucosyl derivatives of para-lacto-N-hexaose and para-lacto-N-neohexaose. *The Journal of Biological Chemistry* 252, 5408–5411.
- Yan, H., and Ajuwon, K. M. (2017). Butyrate modifies intestinal barrier function in IPEC-J2 cells through a selective upregulation of tight junction proteins and activation of the Akt signaling pathway. *PLoS ONE* 12, e0179586. doi: 10.1371/journal.pone.0179586
- Yan, L., Jang, H. D., and Kim, I. H. (2011). Effects of Varying Creep Feed Duration on Pre-weaning and Post-weaning Performance and Behavior of Piglet and Sow. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 24, 1601–1606.
- Yang, H., Xiong, X., Wang, X., Tan, B., Li, T., and Yin, Y. (2016). Effects of Weaning on Intestinal Upper Villus Epithelial Cells of Piglets. *PLoS ONE* 11, e0150216. doi: 10.1371/journal.pone.0150216
- Yao, Q., Gao, Y., Wang, F., Delcenserie, V., Wang, J., and Zheng, N. (2024a). Label-Free quantitation of milk oligosaccharides from different mammal species and heat treatment influence. *Food Chemistry* 430, 136977. doi: 10.1016/j.foodchem.2023.136977
- Yao, Y., Shang, W., Bao, L., Peng, Z., and Wu, C. (2024b). Epithelial-immune cell crosstalk for intestinal barrier homeostasis. *European Journal of Immunology* 54, 2350631. doi: 10.1002/eji.202350631
- Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P. G., and van Ree, R. (2002). Allergy, Parasites, and the Hygiene Hypothesis. *Science* 296, 490–494. doi: 10.1126/science.296.5567.490
- Yida, Z., Imam, M. U., Ismail, M., Ismail, N., Ideris, A., and Abdullah, M. A. (2015). High fat diet-induced inflammation and oxidative stress are attenuated by N-acetylneuraminic acid in rats. *Journal of Biomedical Science* 22, 96. doi: 10.1186/s12929-015-0211-6
- Yoshida, M., Claypool, S. M., Wagner, J. S., Mizoguchi, E., Mizoguchi, A., Roopenian, D. C., et al. (2004). Human Neonatal Fc Receptor Mediates Transport of IgG into Luminal Secretions for Delivery of Antigens to Mucosal Dendritic Cells. *Immunity* 20, 769–783. doi: 10.1016/j.immuni.2004.05.007
- Yu, Y., Mishra, S., Song, X., Lasanajak, Y., Bradley, K. C., Tappert, M. M., et al. (2012). Functional Glycomic Analysis of Human Milk Glycans Reveals the Presence of Virus Receptors and Embryonic Stem Cell Biomarkers\*. *Journal of Biological Chemistry* 287, 44784–44799. doi: 10.1074/jbc.M112.425819
- Yu, Z.-T., Chen, C., and Newburg, D. S. (2013). Utilization of major fucosylated and sialylated human milk oligosaccharides by isolated human gut microbes. *Glycobiology* 23, 1281–1292. doi: 10.1093/glycob/cwt065
- Zenhom, M., Hyder, A., de Vrese, M., Heller, K. J., Roeder, T., and Schrezenmeir, J. (2011). Prebiotic Oligosaccharides Reduce Proinflammatory Cytokines in Intestinal Caco-2 Cells via Activation of PPAR $\gamma$  and Peptidoglycan Recognition Protein 31–3. *The Journal of Nutrition* 141, 971–977. doi: 10.3945/jn.110.136176

- Zhang, B., Lingga, C., Bowman, C., and Hackmann, T. J. (2021a). A New Pathway for Forming Acetate and Synthesizing ATP during Fermentation in Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 87, e02959-20. doi: 10.1128/AEM.02959-20
- Zhang, W., He-Yang, J., Tu, W., and Zhou, X. (2021b). Sialylated human milk oligosaccharides prevent intestinal inflammation by inhibiting toll like receptor 4/NLRP3 inflammasome pathway in necrotizing enterocolitis rats. *Nutrition and Metabolism* 18. doi: 10.1186/s12986-020-00534-z
- Zhang, W., Vervoort, J., Pan, J., Gao, P., Zhu, H., Wang, X., et al. (2022). Comparison of twelve human milk oligosaccharides in mature milk from different areas in China in the Chinese Human Milk Project (CHMP) study. *Food Chemistry* 395. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133554
- Zhang, W., Yan, J., Wu, L., Yu, Y., Ye, R. D., Zhang, Y., et al. (2019a). In vitro immunomodulatory effects of human milk oligosaccharides on murine macrophage RAW264.7 cells. *Carbohydrate polymers* 207, 230–238. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.11.039
- Zhang, Y., Chen, H., Zhu, W., and Yu, K. (2019b). Cecal Infusion of Sodium Propionate Promotes Intestinal Development and Jejunal Barrier Function in Growing Pigs. *Animals* 9, 284. doi: 10.3390/ani9060284
- Zhao, C., Wu, Y., Liu, X., Liu, B., Cao, H., Yu, H., et al. (2017). Functional properties, structural studies and chemo-enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology* 66, 135–145. doi: 10.1016/j.tifs.2017.06.008
- Zhao, M., Liu, H., Liu, M., Yue, Z., Li, C., Liu, L., et al. (2024). Metagenomics and metabolomics reveal that gut microbiome adapts to the diet transition in Hyla rabbits. *Microbiological Research* 283, 127705. doi: 10.1016/j.micres.2024.127705
- Zheng, L., Kelly, C. J., Battista, K. D., Schaefer, R., Lanis, J. M., Alexeev, E. E., et al. (2017). Microbial-Derived Butyrate Promotes Epithelial Barrier Function through IL-10 Receptor-Dependent Repression of Claudin-2. *The Journal of Immunology* 199, 2976–2984. doi: 10.4049/jimmunol.1700105
- Zilber-Rosenberg, I., and Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 723–735. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x
- Zuurveld, M., Ayechu-Muruzabal, V., Folkerts, G., Garssen, J., van't Land, B., and Willemsen, L. E. M. (2023). Specific Human Milk Oligosaccharides Differentially Promote Th1 and Regulatory Responses in a CpG-Activated Epithelial/Immune Cell Coculture. *Biomolecules* 13, 263. doi: 10.3390/biom13020263



**Titre :** Diversité structurale des oligosaccharides du lait et liens fonctionnels avec les capacités métaboliques des bactéries commensales et la réponse immunitaire intestinales chez le porc et le lapin

**Mots clés :** Oligosaccharides du lait, Microbiote, Système immunitaire, Porc, Lapin, Intestin

**Résumé :** Les troubles digestifs sont fréquemment rencontrés autour du sevrage en élevages porcin et cunicole, en lien avec le développement incomplet de la barrière intestinale de ces espèces. Dans un contexte de réduction de l'usage des antibiotiques, de nouvelles stratégies nutritionnelles doivent être développées pour préserver la santé digestive au moment du sevrage. Premiers prébiotiques naturels disponibles pour le nouveau-né, les oligosaccharides du lait régulent la composition du microbiote intestinal et modulent la réponse immunitaire de l'hôte, jouant un rôle crucial dans l'assemblage de l'hobionte. Toutefois, l'impact de la structure des oligosaccharides du lait sur le microbiote et l'immunité mucoale intestinale reste peu exploré. Ce travail de thèse avait pour objectif de comprendre les interactions fonctionnelles entre la diversité structurale des oligosaccharides, les capacités métaboliques des bactéries intestinales commensales et la réponse immunitaire intestinale, afin de favoriser la maturation de la barrière intestinale au sevrage. Dans un premier temps, afin d'appréhender la diversité structurale des oligosaccharides du lait, une approche *in silico* a permis de construire un thésaurus de synonymes pour standardiser les noms des oligosaccharides du lait, ainsi qu'un corpus annoté de textes scientifiques pour des applications futures en analyse automatisée de textes. Ces outils permettront à terme d'évaluer les patrons de diversité des oligosaccharides du lait au sein et entre les espèces. Dans un second temps, nous avons étudié *in vitro* la fonctionnalité des oligosaccharides du lait sur les bactéries intestinales commensales de porcelets et lapereaux et les cellules immunitaires caecales de lapereaux. Nous avons démontré que la capacité métabolique de 9 souches, sélectionnées parmi 240 isolats obtenus en culture anaérobie à partir de fèces de porcelets et de contenu caecal de lapereaux allaités, diffère en fonction de la structure de l'oligosaccharide (2'-fucosyllactose, 3'-sialyllactose, 6'-sialyllactose et lacto-N-tetraose) et de l'espèce bactérienne. Une analyse du génome complet nous a permis de valider ces résultats *in silico*. Nous avons ensuite développé un modèle d'isolement, de culture et de stimulation des cellules mononucléées de la lamina propria caecale de lapereaux, permettant d'étudier leurs interactions directes et indirectes (au travers des métabolites bactériens) avec les oligosaccharides du lait. Si les oligosaccharides seuls n'ont eu que peu d'effets immunomodulateurs, les métabolites modulaient significativement la réponse immunitaire. L'ensemble de ces résultats soulignent l'importance de la structure des oligosaccharides du lait dans leurs interactions avec le microbiote et l'immunité intestinale. Les nouveaux outils développés dans le cadre de ce travail pourront contribuer à une meilleure caractérisation des effets d'autres nutriments ou postbiotiques sur le microbiote et l'immunité des porcelets et lapereaux. A terme, des recherches intégrant la complexité de la barrière intestinale permettront d'évaluer plus finement les bénéfices santé des oligosaccharides du lait en vue d'établir des stratégies de supplémentation adaptées aux élevages porcins et cunicoles.

**Title:** Structural diversity of milk oligosaccharides and functional links with the metabolic capacities of commensal bacteria and the immune response in the gut of pigs and rabbits.

**Key words:** Milk oligosaccharides, Microbiota, Immune system, Pig, Rabbit, Gut

**Abstract:** Digestive disorders frequently occur around weaning on pig and rabbit farms, due to the incomplete development of the intestinal barrier in these species. In a context of antibiotic use reduction, developing new nutritional strategies to preserve digestive health around weaning is essential. Milk oligosaccharides, the first natural prebiotics available to newborns, regulate the composition of the intestinal microbiota and modulate the host immune response, playing a crucial role in holobiont assembly. However, the impact of milk oligosaccharide's structure on the microbiota and intestinal mucosal immunity remains largely unexplored. This PhD work aimed to understand the functional interactions between the structural diversity of milk oligosaccharides, the metabolic capacities of commensal intestinal bacteria, and the intestinal immune response. The ultimate purpose was to promote intestinal barrier maturation at weaning and limit digestive disorder incidence. First, an *in-silico* approach was used to create a thesaurus of synonyms and standardize the names of milk oligosaccharides identified in the scientific literature. This approach also involved creating an annotated corpus of scientific texts for future text mining applications. These tools will enable us to assess diversity patterns of milk oligosaccharides within and between species, including pigs and rabbits, our species of interest. Secondly, we studied the functional impact of milk oligosaccharides on the commensal intestinal bacteria of piglets and rabbits, as well as the cecal immune cells of rabbits, *in vitro*. We demonstrated that the metabolic capacity of nine strains selected from 240 isolates obtained from piglet feces and suckling rabbit ceca in anaerobic culture, differs according to oligosaccharide structure (2'-fucosyllactose, 3'-sialyllactose, 6'-sialyllactose and lacto-N-tetraose) and bacterial species within the same genus. Analyzing the complete genomes of eight of these strains validated these results *in silico*. We then developed a model to isolate, culture, and stimulate mononuclear cells from the cecal lamina propria of rabbits. This enabled us to study the direct and indirect (via bacterial metabolites) effects of milk oligosaccharides on these cells. While milk oligosaccharides alone had little immunomodulatory effects, the metabolites derived from their bacterial degradation, notably propionate and isovalerate, significantly modulated the immune response. These results highlight the importance of the structure of milk oligosaccharides in their interactions with the microbiota and intestinal immunity. Ultimately, integrating research that considers the complexity of the intestinal barrier will enable a more detailed evaluation of the health benefits of milk oligosaccharides and guide the development of supplementation strategies for pig and rabbit farming.