

SYSTÈMES DIGESTIFS ARTIFICIELS : APPLICATIONS EN NUTRITION ET SANTÉ CANINE

IN VITRO GUT MODELS: APPLICATIONS TO CANINE NUTRITION AND HEALTH

Par Charlotte DESCHAMPS^{1,3}, Sylvain DENIS¹, Delphine HUMBERT², Emmanuelle APPER³, Stéphanie BLANQUET-DIOT^{1*}.

(Communication présentée le 4 mai 2023, manuscrit accepté le 30 mai 2023)

RÉSUMÉ

De nombreuses études ont démontré l'importance de la digestion et du microbiote intestinal dans la nutrition et la santé des chiens. Les systèmes digestifs artificiels représentent une alternative pertinente aux essais *in vivo*, en accord avec la réglementation européenne des 3R. Aujourd'hui, une dizaine de modèles *in vitro* statiques ou dynamiques reproduisant une ou plusieurs parties du tractus gastro-intestinal du chien ont été développés, en prenant en compte les paramètres physicochimiques, mécaniques et/ou microbiens de la digestion canine. Ces modèles permettent d'étudier en laboratoire, le devenir de produits alimentaires et vétérinaires dans l'environnement digestif du chien, notamment en termes de digestibilité des macronutriments, bioaccessibilité de micronutriments, survie et activité de microorganismes ou pharmacocinétique des médicaments. Afin d'élargir leurs potentiels, ces modèles pourront dans un futur proche être couplés à des modèles cellulaires ou être adaptés pour reproduire des conditions pathologiques comme l'obésité.

Mots clés : modèle digestif *in vitro*, chien, nutrition, santé, microbiote

ABSTRACT

Numerous studies have demonstrated the importance of digestion and gut microbiota in the nutrition and health of dogs. Artificial digestive systems represent a relevant alternative to *in vivo* assays, in accordance with the European 3Rs rules. Today, a dozen static or dynamic *in vitro* models reproducing one or more parts of the dog's gastrointestinal tract have been developed, considering the physicochemical, mechanical and/or microbial parameters of the canine digestion. These models make it possible to study in the laboratory the fate of food and veterinary products in the dog's digestive environment, particularly in terms of macronutrient digestibility, micronutrient bioaccessibility, microorganisms' survival and activity or drugs' pharmacokinetics. In order to expand their potential, in the near future these models may be coupled with cellular models or adapted to reproduce pathological conditions, such as obesity.

Keywords: *in vitro* gut model, dog, nutrition, health, microbiota

1- Université Clermont Auvergne, UMR 454 MEDIS UCA-INRAE, F-63000 Clermont-Ferrand, France

2- Dômes Pharma, 63430 Pont-du-Château, France

3- Lallemand Animal Nutrition, F-31702 Blagnac Cedex, France

*auteur correspondant : stephanie.blanquet@uca.fr

INTRODUCTION

De nos jours, l'espèce canine compte environ 400 races dont la taille et le poids varient de 1 kg pour un Chihuahua à 100 kg pour un Saint-Bernard. Les animaux de compagnie, et en particulier les chiens, occupent une place à part entière dans la famille, et leur santé et leur bien-être sont d'une importance capitale pour leurs propriétaires. La digestion est un phénomène régionalisé et complexe, contrôlé par voies nerveuses et hormonales et impliquant de très nombreux mécanismes physicochimiques, mécaniques et microbiens, qui joue un rôle clé dans la santé du chien. En particulier, au cours de la dernière décennie, un nombre croissant d'études a montré le rôle essentiel des microorganismes habitant le tractus gastro-intestinal du chien, ou microbiote intestinal, en nutrition et santé canines (Pilla & Suchodolski 2020).

Le développement de nouveaux produits alimentaires et vétérinaires doit prendre en compte tous ces aspects de la digestion du chien, afin de répondre à des problématiques importantes telles que la digestibilité des aliments, la bioaccessibilité des micronutriments, la survie et l'activité des probiotiques, ou encore la libération et l'absorption des médicaments dans le tractus gastro-intestinal. L'étude du devenir et de l'efficacité de ces produits dans l'environnement digestif du chien se fait généralement grâce à des études cliniques *in vivo*. Cependant, ces essais sont de plus en plus limités par des

contraintes réglementaires, éthiques et sociétales, et le coût élevé de ces essais. Or, la mise sur le marché d'un nouvel additif alimentaire ou médicament est associée à une exigence de plus en plus forte d'apport de justifications scientifiques, dans un contexte où il devient difficile de mener des essais sur les animaux. En effet, les règles européennes et nord-américaines des "3R" (pour « *Reduce* », « *Refine* » et « *Replace* ») encouragent fortement une diminution drastique du nombre d'animaux utilisés en recherche et prônent le développement d'approches alternatives *in vitro*.

MODÈLES *IN VITRO* DE LA DIGESTION DU CHIEN

Une des approches alternatives aux essais *in vivo* chez le chien est l'utilisation de systèmes digestifs artificiels, qui reproduisent les phénomènes physicochimiques, mécaniques et/ou microbiens de la digestion canine. Il existe actuellement dans le monde très peu de modèles *in vitro* reproduisant l'environnement gastro-intestinal du chien. Depuis 1995, seuls 13 modèles ont été développés reproduisant les compartiments gastrique, intestinal et/ou colique, mais il n'existe pas, à ce jour, de modèle de la phase orale chez le chien (Tableau 1). La majorité des systèmes développés reproduisent le côlon du chien et sont des modèles statiques, très simplifiés, qui ne prennent pas en compte le dynamisme et la régionalisation donc la complexité des processus de digestion *in vivo*.

Références	Compartiment reproduit	Anaérobiose	Adaptations basées sur des données <i>in vivo</i>	Adaptation à la taille du chien	Paramètres physicochimiques						Présence du microbiote		
					Température corporelle	Régulation du pH	Temps de transit	Adaptation à la nourriture du chien	Sécrétions digestives	Absorption	Lumen	Mucus	
MODÈLES DU TRACTUS DIGESTIF SUPÉRIEUR													
de Castro Santos Melo <i>et al.</i> (2021)	Statique	Estomac et intestin grêle	Non	Oui	Non	37°C	Non	Non	Non	Pepsine, trypsine, sels biliaires	Non	Non	Non
Hervera <i>et al.</i> (2007)		Estomac et intestin grêle	Non	Oui	Non	39°C	Non	Non	Croquettes broyées	Pepsine et pancréatine	Non	Non	Non
Lee <i>et al.</i> (2017) Artificial Stomach-Duodenum	Dynamique	Estomac et duodénum	Non	Oui	Non	37°C	Non	Oui	Non	Pancréatine	Non	Non	Non
Smeets-Peeters <i>et al.</i> (1999) FIDO		Estomac, duodénum, jéjunum et iléon	Non	Oui (revue de la littérature publiée)	Non	37°C	Oui	Oui	Croquettes ou pâte broyées	Pepsine, trypsine, pancréatine, électrolytes et bile	Passive	Non	Non
MODÈLES DU TRACTUS DIGESTIF INFÉRIEUR													
Vierbaum <i>et al.</i> (2019)	Statique	Colon	Oui Flux de N ₂	Non	Non	37°C	Non	Non	Non	Non	Non	Oui, fèces	Non
Cuttrignelli <i>et al.</i> (2009)		Colon	Oui	Non	Non	39°C	Non	Non	Non	Non	Non	Oui, fèces	Non
Sunvold <i>et al.</i> (1995)		Colon	Oui Flux de CO ₂	Non	Non	39°C	Non	Non	Non	Non	Non	Oui, fèces	Non
Van den Abbeele <i>et al.</i> (2020)		Colon	Oui Flux de N ₂	Non	Non	39°C	Non	Non	Non	Non	Non	Oui, fèces	Non
Tzortzis <i>et al.</i> (2004)		Colon	Oui Flux de N ₂	Non	Non	37°C	Non	Non	Non	Non	Non	Oui, fèces	Non
Panasovich <i>et al.</i> (2013)		Colon	Oui Flux de CO ₂	Oui	Non	39°C	Non	Non	Non	Non	Non	Oui, fèces	Non
Oba <i>et al.</i> (2020)		Colon	Oui Flux de N ₂	Non	Non	39°C	Non	Non	Non	Non	Non	Oui, fèces	Oui
Bosch <i>et al.</i> (2008)	Dynamique	Iléon, colon proximal, transverse et distal	Oui Flux de CO ₂	Non	Non	39°C	Non	Non	Non	Non	Non	Oui, digesta colique	Non
Verstrepen <i>et al.</i> (2021) M-SCIME		Estomac, intestin grêle, colon proximal et distal	Oui Flux de N ₂	Oui	Non	39°C	Oui	Oui	Oui	Jus pancréatique et bile	Passive	Oui, fèces	Oui
CANIM-ARCOL ¹	Dynamique	Colon	Oui, maintenue par la seule activité du microbiote résident	Oui (revue de la littérature publiée)	Oui Petit, moyen et grand	39°C	Oui	Oui	Oui	Acides biliaires	Non	Oui, fèces	Oui

Tableau 1 : Principaux modèles de digestion/fermentation *in vitro* pour reproduire l'environnement digestif du chien et leurs caractéristiques. CANIM-ARCOL: Canine Mucosal Artificial Colon; CO₂, dioxyde de carbone; FIDO, Functional gastroIntestinal DOg model; N₂, nitrogène; M-SCIME, Mucosal Simulator of the Canine Intestinal Microbial Ecosystem.

¹ Deschamps *et al.* 2023 (soumis)

Modèles *in vitro* du tractus digestif supérieur

Différents modèles reproduisant le tractus digestif supérieur ont été mis au point, simulant de façon simplifiée les phénomènes enzymatiques de la digestion dans l'estomac et l'intestin grêle. Ces modèles sont des fioles dans lesquelles sont mélangés des aliments broyés pour chiens et des enzymes digestives (pepsine et pancréatine) (Hervera *et al.* 2007 ; de Castro Santos Melo *et al.* 2021). En 1999, un modèle dynamique très complet de l'estomac et de l'intestin grêle du chien a été développé aux Pays-Bas, la technologie du modèle gastro-intestinal du TNO appelé TIM-1, mis au point à l'origine pour reproduire les conditions digestives humaines (Smeets-Peeters *et al.* 1999). Ce modèle, appelé FIDO (*Functional gastroIntestinal DOg model*), intègre tous les compartiments digestifs supérieurs (estomac, duodénum, jéjunum et iléon) et reproduit l'essentiel des paramètres de la digestion chez le chien, comme la température corporelle, la cinétique du pH gastrique et de l'intestin grêle, le temps de vidange des compartiments gastrique et iléal, le temps de transit entre chaque compartiment, le brassage du chyme alimentaire, l'administration séquentielle des sécrétions digestives (pepsine et lipase dans l'estomac, bile et suc pancréatique dans le duodénum) et l'absorption passive de l'eau et des produits de digestion grâce à des fibres de dialyse connectées au niveau du jéjunum et de l'iléon. FIDO a été conçu pour reproduire les paramètres digestifs de chiens de taille moyenne, sur la base d'une large revue de la littérature (Smeets-Peeters *et al.* 1998). Le modèle a été validé comparativement à des données *in vivo*, mais uniquement pour des applications nutritionnelles. Ainsi, des comparaisons ont été effectuées en termes de digestibilité des protéines ou de bioaccessibilité du calcium, à la fois dans le modèle FIDO et *in vivo* chez des chiens possédant des canules iléales, démontrant la pertinence du système *in vitro*. Malgré sa complexité, ce modèle ne reproduit qu'une partie des phénomènes de la digestion chez le chien. En effet, même s'il est particulièrement pertinent pour simuler les paramètres physico-chimiques ayant lieu dans la lumière digestive de l'estomac et de l'intestin grêle, ce modèle n'intègre pas le microbiote intestinal. Une autre limitation majeure du système FIDO est que les aliments doivent être finement mixés avant leur introduction dans l'estomac, ce qui peut largement influencer la digestibilité des macronutriments et la bioaccessibilité des micronutriments, et reste très loin de la réalité chez le chien qui avale grossièrement les aliments plutôt qu'il ne les mâche finement. Enfin, plus récemment, le modèle de dissolution *Artificial Stomach-Duodenum* (ASD) a été adapté à la digestion du chien dans l'objectif de pouvoir réaliser des études pharmaceutiques de solubilité de formulations orales (Lee *et al.* 2017). Ce modèle bi-compartiment reproduit à la fois l'estomac et le duodénum, avec les pH et les temps de transit associés, ainsi que les sécrétions digestives par l'ajout d'une solution de pancréatine.

Modèles *in vitro* du tractus digestif inférieur

Huit autres dispositifs disponibles sont des modèles *in vitro* statiques reproduisant le côlon du chien, avec des systèmes de

type fermentation en batch (Sunvold *et al.* 1995; Tzortzis *et al.* 2004; Bosch *et al.* 2008; Cutrignelli *et al.* 2009; Vierbaum *et al.* 2019; Van den Abbeele *et al.* 2020; Oba *et al.* 2020). De manière générale, ces systèmes sont constitués d'un seul récipient, inoculé avec une selle de chien adulte mise en suspension dans un tampon ou milieu nutritif, maintenu à 39°C en absence d'oxygène grâce à l'ajout de CO₂ ou de N₂, et sans ajout au cours du temps (système clos). Le plus souvent, la composition du milieu nutritif n'a pas été adaptée pour tenir compte de l'alimentation du chien et est basée sur des milieux de culture précédemment développés pour l'Homme. De façon importante, ce type de modèle ne permet pas de reproduire le temps de transit ou la motilité digestive colique. Le pH n'est également pas régulé et peut évoluer fortement au cours de la fermentation. Ce type de modèle *in vitro* est généralement utilisé pour évaluer la digestibilité des fibres alimentaires et la production d'acides gras à chaîne courte, qui sont des produits de fermentation majeurs issus de l'activité fermentaire du microbiote. Un modèle plus complet a été développé reproduisant les compartiments de l'iléon, du côlon proximal, du côlon transverse ou du rectum dans différentes fioles inoculées avec les fluides digestifs correspondants, collectés à partir de chiens adultes (Bosch *et al.* 2008). Cependant, ce modèle reproduit uniquement l'anaérobiose des compartiments et la température corporelle du chien, les paramètres tels que le pH, le temps de transit ou le brassage n'étant pas reproduits. Malgré l'intérêt de la multi-compartimentation, le principal inconvénient de ce modèle est la nécessité d'utiliser une méthode invasive pour collecter des fluides digestifs *in vivo* afin d'inoculer les fioles *in vitro*. Enfin, à ce jour, un seul modèle de fermentation statique reproduit le mucus intestinal en intégrant des microcosmes recouverts de mucine (Oba *et al.* 2020). En effet, l'épithélium intestinal est tapissé sur toute sa longueur d'une couche protectrice de mucus qui peut être colonisée par des bactéries spécifiques. La présence de mucus *in vitro* permet ainsi de reproduire cette niche écologique qui joue un rôle important dans la santé de l'hôte.

À côté de ces systèmes statiques, deux modèles dynamiques du côlon ont été développés, intégrant les paramètres nutritionnels, physicochimiques et microbiens spécifiques de ce compartiment digestif. Ces deux modèles ont été initialement développés chez l'Homme et adaptés plus récemment au porc et au chien. Le *Canine M-ARCOL* (CANIM-ARCOL) reproduit la composition nutritionnelle et les profils de sels biliaires de l'environnement colique du chien, le pH, le temps de transit, et distingue les microenvironnements luminal et mucosal de l'écosystème digestif du chien. De façon originale, ce modèle est le seul où l'anaérobiose est maintenue par la seule activité du microbiote résident, permettant d'étudier la composition des gaz fermentaires produits par le microbiote. Ce modèle est également le seul à avoir été adapté à différentes tailles de chiens (« petit » de moins de 10 kg, « moyen » de 10 à 30 kg et « grand » de plus de 30 kg) et a été validé par des comparaisons *in vitro-in vivo*. Le second modèle dynamique est le *Mucosal Simulator of the Canine Intestinal Microbial Ecosystem* (M-SCIME). C'est actuellement le seul à reproduire l'ensemble du tractus gastro-intestinal du chien, de l'estomac au colon, à l'aide de quatre bioréacteurs reproduisant l'estomac, l'intestin grêle, le côlon proximal et distal (Verstrepen *et al.* 2021). Ce modèle reproduit

la température corporelle, la régionalisation du pH gastrique et intestinal, le temps de transit gastro-intestinal, les sécrétions digestives (suc pancréatique et bile), l'anaérobiose et le microbiote luminal et mucosal dans les compartiments coliques. Le modèle M-SCIME n'a été adapté que pour reproduire la digestion de chien de taille moyenne et validé par comparaison avec des données *in vivo* obtenues lors d'une étude clinique impliquant dix Beagles.

APPLICATIONS DES MODÈLES *IN VITRO* DE DIGESTION

Les modèles *in vitro* de digestion représentent une plateforme puissante pour étudier le devenir de tout intrant positif ou négatif dans l'environnement digestif du chien (Figure 1). Ils peuvent ainsi fournir des informations précieuses sur les mécanismes d'action de produits déjà sur le marché (génériques, extension de gamme...) et/ou participer au développement de nouveaux produits tels que des aliments spécialisés ou des médicaments innovants. Même s'ils restent très simples, les modèles mono-compartimentés statiques sont des outils intéressants pour effectuer le criblage d'un grand nombre de composés en raison de leur faible coût et de leur facilité de manipulation. Les systèmes multi-compartimentés dynamiques reproduisent des conditions digestives plus physiologiques, mais nécessitent une forte expertise pour être manipulés et ne peuvent être appliqués qu'à un nombre réduit de composés d'intérêt.

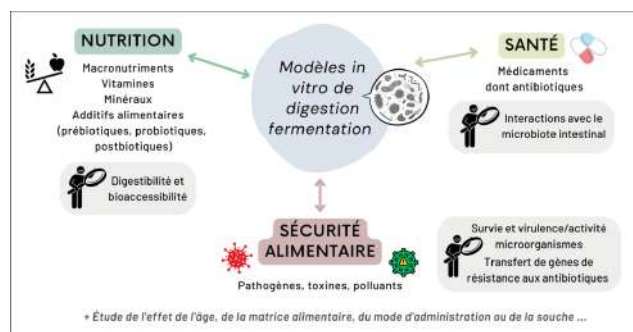


Figure 1 : Principales applications des modèles *in vitro* de digestion/fermentation.

À ce jour, les modèles *in vitro* simulant l'environnement digestif du chien ont été principalement utilisés pour des applications nutritionnelles. Les principales applications concernent l'évaluation de la digestibilité des macronutriments (protéines, lipides, glucides) et la bioaccessibilité de micronutriments tels que vitamines ou minéraux, ou de phytoconstituants comme les polyphénols. Ces systèmes peuvent aussi fournir des informations précieuses sur les effets de composés non entièrement digérés dans l'intestin grêle, comme les fibres alimentaires (dont certaines possèdent des propriétés prébiotiques), sur la composition et l'activité du microbiote intestinal, *e.g.* par le biais de mesures de la production d'acides gras à chaîne courte et/ou branchés ou des gaz fermentaires. Des souches probiotiques peuvent aussi être testées dans les modèles *in vitro* pour évaluer leur survie (et l'effet du mode d'ad-

ministration), leur activité métabolique par exemple via la production de composés antimicrobiens tels que les bactériocines et/ou leurs interactions avec le microbiote intestinal (Ogué-Bon *et al.* 2011).

Concernant les applications en santé et notamment en médecine vétérinaire, la cinétique de libération et d'absorption des médicaments peut être suivie tout au long du tractus gastro-intestinal, ainsi que l'influence des formulations orales, de différentes doses d'administration, de l'état nourri ou à jeun, de la matrice alimentaire (interactions aliment-médicament), et les interactions avec d'autres médicaments. À l'heure actuelle, la posologie des médicaments n'est établie qu'en fonction du poids corporel ou du poids métabolique du chien. L'utilisation de ces approches *in vitro*, et notamment du CANIM-ARCOL, pourrait permettre de mieux appréhender l'impact de certains paramètres digestifs associés à la taille du chien et susceptibles d'influencer la bioaccessibilité des médicaments. En outre, les systèmes digestifs artificiels permettent d'obtenir des connaissances nouvelles sur la métabolisation des médicaments destinés au chien par le microbiote intestinal et/ou les effets de ces médicaments sur sa composition et ses fonctions métaboliques. À titre d'exemple, les perturbations induites par une antibiothérapie orale ont été reproduites de façon pertinente dans le CANIM-ARCOL, puis l'efficacité de stratégies de restaurations du microbiote basées sur des prébiotiques et postbiotiques a été démontrée.

CHALLENGES ET LIMITES DES MODÈLES *IN VITRO*

Aujourd'hui, la première limite des modèles dynamiques est le faible nombre de réplicats biologiques. Ceci peut être amélioré en augmentant le débit des modèles dynamiques pour tester un plus grand nombre de selles et prendre en compte la variabilité interindividuelle, pour aller vers de la médecine ou nutrition personnalisées. D'autre part, malgré leurs nombreux intérêts et applications, les systèmes digestifs artificiels restent des modèles et ne reproduisent pas les interactions avec les cellules de l'hôte, notamment intestinales et immunitaires, ni les contrôles nerveux et hormonaux de la digestion. Pour pallier une partie de ces limites, les modèles *in vitro* peuvent être couplés avec des modèles de lignées cellulaires voire des organoïdes, afin de réaliser des études mécanistiques (*e.g.* suivi des voies métaboliques des cellules intestinales, comme des voies de l'inflammation) ou de toxicité. Si les données *in vivo* nécessaires sont disponibles, le potentiel des systèmes *in vitro* peut théoriquement être ajusté en fonction de la matrice alimentaire, de l'âge ou de la race des chiens, mais aussi reproduire des situations physiologiques comme pathologiques (*e.g.* pathologies inflammatoires intestinales, obésité...). Ces modèles *in vitro* peuvent s'intégrer très facilement dans le processus de commercialisation de nouveaux additifs alimentaires ou de produits de médecine vétérinaire, comme alternative à l'expérimentation animale (Figure 2). En particulier, ils permettent pour les plus simples de réaliser des études préliminaires de sélection des composés d'intérêt, puis de fournir des éléments sur leur devenir dans l'environnement digestif du chien, et des premières preuves de leur efficacité. Néanmoins, des essais cliniques seront nécessaires pour obtenir

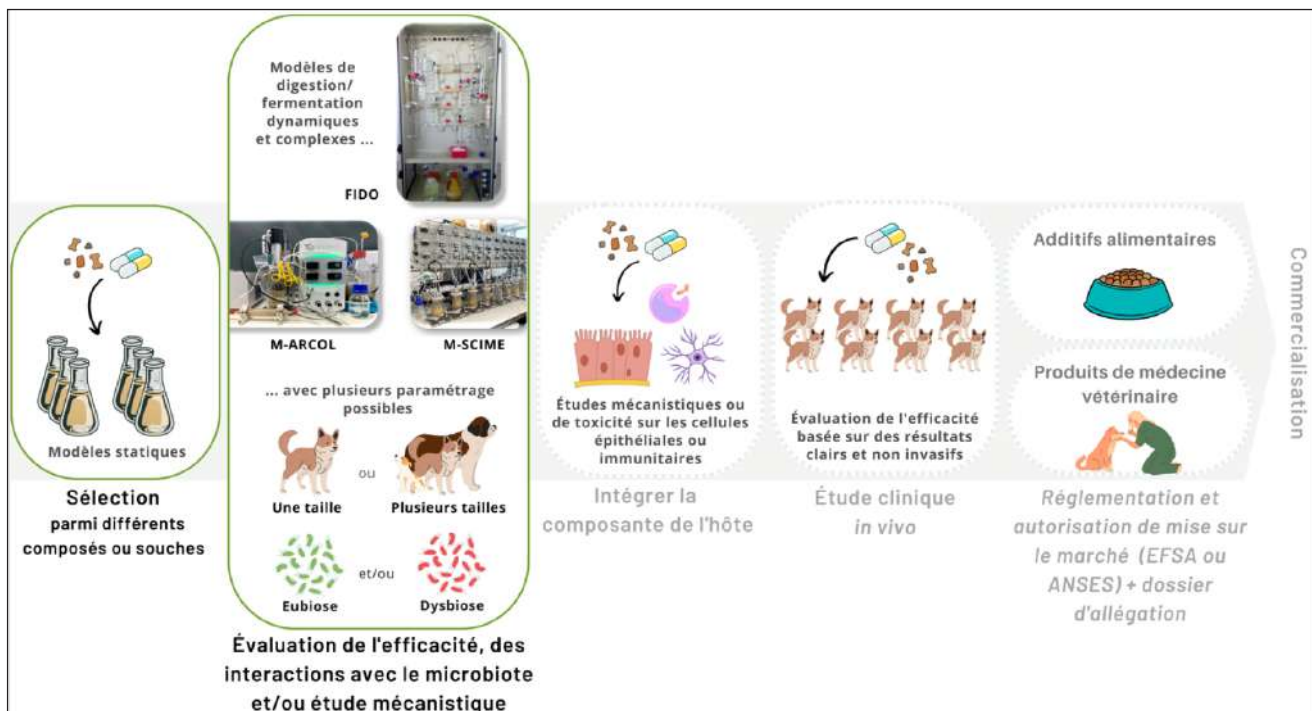


Figure 2 : Positionnement des modèles *in vitro* de digestion/fermentation statiques et dynamiques dans la chaîne de commercialisation d'un nouvel additif alimentaire ou un médicament.

BIBLIOGRAPHIE

- Bosch G, Pellikaan WF, Rutten PGP, van der Poel AFB, Verstegen MWA, Hendriks WH. Comparative *in vitro* fermentation activity in the canine distal gastrointestinal tract and fermentation kinetics of fiber sources. *J. Anim. Sci.* 2008; 86: 2979–2989.
- de Castro Santos Melo C, da Silva Freire A, Galdeano MA, da Costa CF, de Oliveira Gonçalves APD, Dias FS, Menezes DR. Probiotic potential of *Enterococcus hirae* in goat milk and its survival in canine gastrointestinal conditions simulated *in vitro*. *Res Vet Sci.* 2021; 138: 188–195.
- Cutrignelli MI, Bovera F, Tudisco R, D'Urso S, Marono S, Piccolo G, Calabrò S. *In vitro* fermentation characteristics of different carbohydrate sources in two dog breeds (German shepherd and Neapolitan mastiff). *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2009; 93: 305–312.
- Hervera M, Baucells MD, Blanch F, Castrillo C. Prediction of digestible energy content of extruded dog food by *in vitro* analyses. *Anim Physiol Anim Nutr.* 2007; 91: 205–209.
- Lee CM, Luner PE, Locke K, Briggs K. Application of an Artificial Stomach-Duodenum Reduced Gastric pH Dog Model for Formulation Principle Assessment and Mechanistic Performance Understanding. *J Pharm Sci.* 2017; 106: 1987–1997.
- Oba PM, Vidal S, Wyss R, Miao Y, Adesokan Y, Swanson KS. Effect of a novel animal milk oligosaccharide bio-similar on the gut microbial communities and metabolites of *in vitro* incubations using feline and canine fecal inocula. *J. Anim. Sci.* 2020; 98: skaa273.
- Panasevich MR, Rossoni Sero MC, de Godoy MRC, Swanson KS, Guérin-Deremaux L, Lynch GL *et al.* Potatoe fiber as a dietary fiber source in dog foods. *J. Anim. Sci.* 2013; 91: 5344–5352.
- Pilla R, Suchodolski JS. The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease. *Front Vet Sci.* 2020; 6: 498.
- Smeets-Peeters M, Watson T, Minekus M, Havenaar R. A review of the physiology of the canine digestive tract related to the development of *in vitro* systems. *Nut Res Rev.* 1998; 11: 45–69.
- Smeets-Peeters MJ, Minekus M, Havenaar R, Schaafsma G, Verstegen MW. Description of a dynamic *in vitro* model of the dog gastrointestinal tract and an evaluation of various transit times for protein and calcium. *Altern Lab Anim.* 1999; 27: 935–949.
- Sunvold GD, Hussein HS, Fahey GC, Merchen NR, Reinhart GA. *In vitro* fermentation of cellulose, beet pulp, citrus pulp, and citrus pectin using fecal inoculum from cats, dogs, horses, humans, and pigs and ruminal fluid from cattle. *J. Anim. Sci.* 1995; 73: 3639–3648.
- Tzortzis G, Goulas AK, Baillon MLA, Gibson GR, Rastall RA. *In vitro* evaluation of the fermentation properties of ga-

lactooligosaccharides synthesized by alpha-galactosidase from *Lactobacillus reuteri*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004; 64: 106–111.

• Van den Abbeele P, Moens F, Pignataro G, Schnurr J, Ribecco C, Gramenzi A, Marzorati M. Yeast-Derived Formulations Are Differentially Fermented by the Canine and Feline Microbiome As

Assessed in a Novel *In Vitro* Colonic Fermentation Model. *J Agric Food Chem.* 2020; acs.jafc.9b05085.

• Verstrepen L, Van den Abbeele P, Pignataro G, Ribecco C, Gramenzi A, Hesta M. & Marzorati M. Inclusion of small intestinal absorption and simulated mucosal surfaces further improve the Mucosal Simulator of the Canine Intesti-

nal Microbial Ecosystem (M-SCIMETM). *Res Vet Sci.* 2021; 140: 100–108.

• Vierbaum L, Eisenhauer L, Vahjen W. & Zentek J. *In vitro* evaluation of the effects of *Yucca schidigera* and inulin on the fermentation potential of the faecal microbiota of dogs fed diets with low or high protein concentrations. *Arch Anim Nutr.* 2019; 73: 399–413.