



Efficient mRNA transfection in intestinal organoids and cell lines

Tanguy Bourrec

► To cite this version:

Tanguy Bourrec. Efficient mRNA transfection in intestinal organoids and cell lines. [Stage] INRAE. 2022, 23 p. hal-03824771

HAL Id: hal-03824771

<https://hal.inrae.fr/hal-03824771v1>

Submitted on 21 Oct 2022

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.

Titre

Efficient mRNA transfection in intestinal organoids and cell lines

Résumé

Efficient food use and disease resistance are two major challenges in pig growth, and are linked to the physiology of the gut. Intestinal pig organoids are three-dimensional cell cultures used as in vitro models. However, because of their culture conditions and structure, transfection efficiency is often reduced. Recently, the development of mRNA synthesis and transfection has opened new opportunities. Because mRNA does not need to enter the nucleus to be expressed, as opposed to plasmid DNA, mRNA transfection efficiency is expected to be greater than with plasmid DNA. We compared mRNA transfection to plasmid transfection in intestinal organoids and cell cultures, to compare their delivery and expression, using fluorescence microscopy, target genes methylation and mRNA expression. From our findings, cell line transfection efficiency varies depending on the type of material used, RNA being more efficient than plasmid transfection, and the culture medium may occasionally make a difference. Transfection of cell lines with CrisprOff plasmid allowed us to modify both methylation and expression of GLUT2, our target gene. Finally, we increased survival rates of our organoids after transfection, and hope to try mRNA transfection of CrisprOff, a new plasmid, to be able to induce epigenetic editing in pig organoids.

L'utilisation efficace des aliments et la résistance aux maladies sont deux défis majeurs de la croissance des porcs liés à la physiologie de l'intestin. Les organoïdes intestinaux de porc sont des cultures cellulaires tridimensionnelles utilisées comme modèles in vitro. Cependant, l'efficacité de leur transfection est faible, en raison de leurs conditions de culture. Récemment, le développement de la transfection par ARNm a ouvert de nouvelles perspectives car il est exprimé dans le cytoplasme, contrairement à l'ADN plasmidique; son efficacité de transfection devrait donc être supérieure à ce dernier. Nous avons comparé la transfection d'ARNm à celle de plasmides dans des organoïdes intestinaux et des cultures cellulaires, pour mesurer leur expression par microscopie à fluorescence, la méthylation des gènes cibles et l'expression d'ARNm. D'après nos résultats, l'efficacité de transfection des lignées est meilleure avec l'ARN que les plasmides, et le milieu de culture pourrait l'influencer également. La transfection des lignées cellulaires avec le plasmide CrisprOff nous a permis de modifier à la fois la méthylation et l'expression de GLUT2, notre gène cible. Nous avons augmenté le taux de survie de nos organoïdes après transfection, et espérons transférer l'ARNm de CrisprOff, afin d'induire une édition épigénétique dans les organoïdes de porc.

Introduction

L'amélioration des conditions d'élevage et de la productivité des espèces agronomiques (vache, porc, mouton, poulet entre autres) permet de répondre à des besoins toujours croissants au niveau de l'alimentation mondiale. Notamment, le porc représente un pourcentage important de la demande en viande; mais son alimentation est encore trop souvent en concurrence avec l'alimentation humaine.

La croissance des porcs est influencée par de nombreux facteurs, qu'ils soient extrinsèques (environnement, congénères) ou intrinsèques (vitesse de développement, résilience). Cette dernière est déterminée par l'efficacité de ses organes, à l'exemple de son système digestif : d'une grande similarité avec l'Homme (Lunney *et al*, 2021), son bon fonctionnement est essentiel pour capter les nutriments fournis au cours de son alimentation, mais également le protéger contre les pathogènes qu'il va rencontrer pendant sa vie et son dysfonctionnement est associé à de nombreux problèmes (sensibilité aux pathogènes, diarrhées liés au sevrage, difficultés de croissance).

Notamment, le fonctionnement des cellules absorbantes de l'intestin ne sont pas encore entièrement comprises, mais de nombreuses équipes de recherche travaillent sur ce sujet

(Zhang *et al*, 2021), qu'il s'agisse de l'absorption directe des cellules (Kishida *et al*, 2017) ou de leur interactions avec l'environnement (Crawford *et al*, 2021).

Afin d'étudier celles-ci, deux approches s'opposaient jusqu'à récemment : l'expérimentation animale d'un côté, mais une meilleure prise en compte du bien être animal nous impose une réduction de son utilisation au strict nécessaire; les cultures cellulaires, de leur côté, ne représentent qu'un modèle partiel en comparaison à la complexité de l'organisme. Ainsi, de nouvelles alternatives sont explorées afin d'atteindre un compromis satisfaisant (Almeqdadi *et al*, 2019); les organoïdes représentent une des pistes les plus intéressantes : leur croissance permet de reproduire des structures tridimensionnelles, davantage similaires à l'organe ciblé.

Afin d'étudier en détail le fonctionnement des organoïdes, il est nécessaire de développer de nouveaux outils; dans l'équipe, j'ai donc travaillé à développer les protocoles de transfection afin de pouvoir moduler et adapter le fonctionnement de ces organoïdes à nos demandes; particulièrement, la transfection que nous utilisons combine la fonction de CrisprCas9, déjà présent pour de nombreuses applications (Smits *et al*, 2021), en particulier dCas9, afin de cibler spécifiquement des régions du génome, mais sans toucher à l'ADN. Notre approche vise la modification de l'épigénome, en particulier la méthylation de gènes cibles, connus pour être impliqués dans l'efficacité alimentaire.

Un des problèmes que nous avons rencontrés concernait le maintien d'une partie assez important des cellules souches des organoïdes pour avoir un renouvellement cellulaire régulier; en effet, nous avons été confrontés à de nombreuses reprises à des densités cellulaires trop faibles pour espérer des bons résultats de transfection (une période d'attente de une semaine ne suffisait pas à obtenir assez de cellules. Pourtant, il existe plusieurs pistes pour conserver cette réserve de cellules souches; par exemple, utiliser certaines molécules empêchant la différenciation des cellules souches telles que le Y27632, ou bien cibler certaines voies métaboliques identifiées comme impliquées dans la différenciation cellulaire (Strubberg *et al*, 2017; Goveas *et al*, 2021).

Au niveau des idées pour améliorer les efficacités de transfection, différentes approches sont remarquables: qu'il s'agisse de systèmes en solution (McLenachan *et al*, 2007) ou de systèmes plus classiques tels que l'électroporation (Gaebler *et al*, 2020), les sources d'inspiration ne manquent pas.

Parmi celles que nous avons mises à profit, je me suis inspiré d'une qui visait à exposer la partie apicale des organoïdes (Li *et al*, 2020), en réalisant des transfections sur une matrice au lieu de laisser les cellules en suspension habituellement.

Nous avons également essayé de réaliser la sélection des cellules transfectées en ajoutant de la puromycine dans le milieu de culture, mais cela n'a pas montré une sélection spécifique des cellules transfectées; le protocole reste donc encore à préciser pour augmenter son efficacité.

L'approche que nous avons le plus approfondi au cours de ces quelques mois reste l'utilisation et la mise au point de CrisprOff (Nuñez *et al*, 2021), un plasmide dont il est prévu de réaliser la transcription in vitro afin de transfecter directement son ARNm aux cellules, qu'il s'agisse d'IPEC ou d'organoïdes.

Matériel et méthodes

Lignées cellulaires utilisées :

IPEC-1 (*Intestinal Pig Epithelial Cells*): Cellules du petit intestin de porc de 12h

IPEC-J2 : Cellules du jéjunum de porc de 12h

Passage des lignées :

Milieux utilisés : Trypsine et DMEM-F12 complet (DMEM-F12 + 5% SVF + 1% P/S)

Le milieu a été retiré le milieu puis les cellules en flasque de 75 cm³ ont été rincées avec 3 ml de trypsine, puis 7 ml de trypsine ont été ajoutés par flasque, qui ont ensuite été mises à

incuber pendant 10 minutes pour dissocier les cellules; 5 ml de DMEM complet ont été ajoutés pour arrêter la dissociation par la trypsine, la densité cellulaire a été mesurée dans une cellule de comptage et les tubes ont été centrifugés 10 minutes à 300 g, puis le culot de cellules a été repris dans 12 ml de DMEM complet; les cellules ont été ensemencées dans une flasque 75 cm³ contenant 15 ml de DMEM complet selon la densité désirée, 50 000 cellules par flasque afin d'arriver à 80-90% de confluence au bout d'une semaine, pour le passage.

Mise en plaque pour transfection 2D :

Un volume de 300µL de DMEM complet a été déposé dans chaque puits dans une plaque 48 puits, puis les cellules ont été ensemencées dans la plaque selon la densité désirée (80 000 cellules par puits).

Réactifs utilisés pour la transfection :

ICAFectin ARN : Le protocole ICAFectin-mRNA Working Protocol de InCellArt a été utilisé, ainsi que les réactifs associés, avec un ratio ARNm:réactif de transfection de 6:1.

ICAFectin ADN : Le protocole ICAFectin-441 Working Protocol de InCellArt a été utilisé, ainsi que les réactifs associés, avec un ratio plasmide:réactif de transfection de 1,5:1

FuGENE : Le protocole FuGENE 6 Transfection Reagent de Promega a été utilisé, ainsi que les réactifs associés, avec un ratio plasmide:réactif de transfection de 1,5:1

Maintien : Les lignées ont été changées de flasque toutes les semaines

Organoïdes utilisés : Colon, Jéjunum, Iléon de porc, généreusement offerts par Martin Beaumont (INRAE, Auzeville-Tolosane)

Passage : Le milieu de chaque puits a été retiré puis les cellules ont été rincées avec 250µL de PBS chauffé à 37°C; 250 µL de Trypsine ont été ajoutés le matrigel a été gratté avec la pointe de la pipette, puis le milieu a été aspiré-refoulé 10 fois pour dissocier les organoïdes, puis la plaque a été mise à incuber 20 minutes. Les milieux ont été homogénéisés par pipetage toutes les 10 minutes. 500 µL de DMEM ont été ajoutés dans chaque puits pour arrêter la digestion, le contenu des puits a été regroupé, puis 10µL de milieu contenant les cellules ont été prélevés pour réaliser une quantification; les tubes ont été centrifugés 5 minutes à 300 g. Le culot a été resuspendu avec du matrigel sur glace, puis 25 µL ont été déposés dans chaque puits d'une plaque 48 puits afin de faire des dômes de matrigel. La plaque a été laissée 15 minutes à l'incubateur pour polymériser les dômes, puis 250 µL de Intesticult + 1% P/S ont été ajoutés dans chaque puits d'une plaque 48 puits.

Milieux utilisés : PBS, Trypsine, DMEM complet , P/S, Intesticult, matrigel

Mise en plaque pour transfection 3D : Le culot après centrifugation a été resuspendu dans le DMEM. 250 µL de cellules dans le DMEM ont été déposées dans chaque puits d'une plaque 12 puits. Les vésicules de transfection préalablement préparées ont été ajoutées sur les cellules, puis la plaque a été centrifugée à 300 g pendant 1h et laissée à incuber à 37°C pendant 4h. Le milieu contenant les cellules a ensuite été récupéré dans un tube de 15ml, puis mis à centrifuger à 300 g pendant 10 minutes; les cellules ont été resuspendues avec du matrigel sur glace, puis 25 µl ont été déposés dans chaque puits d'une plaque 48 puits afin de faire des dômes de matrigel. Le matrigel a été laissé à polymériser 15 minutes à l'incubateur, puis 250 µL de mélange d'intesticult + 1% P/S ont été

ajoutés dans chaque puits de la plaque.

Mise en plaque pour transfection 2D : Dans une plaque 48 puits à 37°C, 200 µL d'un mélange de PBS froid + Matrigel au 1/50 a été déposé dans chaque puits d'une plaque 48 puits, puis laissé à incuber pendant 2h à 37°C. Le PBS a ensuite été retiré, puis 250µL d'intesticult + P/S 1% ont été ajoutés dans chaque puits. Enfin, le volume nécessaire de cellules pour une concentration correcte a été déposé (80 000 cellules dans chaque puits).

Réactifs de transfection : Identiques aux lignées + Lipofectamin3000 : Le protocole Lipofectamine 3000 Reagent de invitrogen a été utilisé ainsi que les réactifs associés, avec un ratio plasmide:réactif de transfection de 1,5:1

Maintien des organoïdes : Le milieu (250 µL intesticult + 1% P/S par puits) a été changé tous les 2 jours, le passage a été réalisé toutes les semaines.

Table 1 : Réactifs utilisés lors des expériences	
Trypsine	https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sigma/t4049?gclid=CjwKCAjwh5qL_BhAlEiwAloods6iZHl4xnPskousi-qKdCpEM-14nCtIkMUrDmb7jL1op8_tXD2m_hxoCuLUQAvD_BwE
DMEM-F12	https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sigma/d8437?%C2%AEion=FR
SVF (Sérum de Veau Foetal)	Gibco™ Sérum de veau foetal, qualifié, Brésil 500 ml voir les résultats Fisher Scientific
Opti-MEM	Opti-MEM I Reduced Serum Media Thermo Fisher Scientific - FR
P/S (Pénicilline/Streptomycine)	Penicillin Streptomycin Solution, Pen-Strep (10,000 U/mL) for Cell Culture
ITS (Insuline - Transferrine - Selenium)	Insulin-Transferrin-Selenium (ITS -G) (100X)
EGF (Epidermal Growth Factor)	354001 Corning® Epidermal Growth Factor (EGF), Mouse Natural (Culture Grade), 100µg, 1/Pack
PBS (Phosphate-Buffered Saline)	https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10010015
Intesticult	https://www.stemcell.com/intesticult-organoid-growth-medium-human.html
Matrigel	Référence 354234 - Matrice Corning Matrigel®, tumeur souris HSC - 10 ml - Dominique Dutscher - Matériel de laboratoire
ICAFectin ARN	https://www.incellart.com/sites/default/files/IMCE/ICAFectin-mRNA-presentation%20%282%29.pdf
ICAFectin ADN	https://www.incellart.com/sites/default/files/IMCE/ICAFectin441-DNA-presentation_0.pdf
FuGENE	FuGENE® 6 Transfection Reagent
Intesticult	https://www.stemcell.com/intesticult-organoid-growth-medium-human.html
Y27	ROCK Inhibitor Y-27632 STEMCELL Technologies
ChIR	CHIR99021 = 98 HPLC 252917-06-9

Table 2 : Plasmides et ARNm utilisés au cours des expériences					
Nom des plasmides	Taille du plasmide	Séquences d'intérêt	Référence Addgene	Gène de résistance	Gène marqueur
pdCas9-DNMT3A-EGFP	10 266 pb	NLS : séquence d'adressage des protéines au noyau dCas9 : fonction nucléase désactivée, pour lier l'ARNg et la protéine effectrice DNMT3A : méthylation des régions cibles	Plasmid #71666	Ampicilline	GFP

		T2A : augmentation de l'expression de EGFP			
CrisprOff v2.1	11 874 pb	DNMT3A : méthylation des régions cibles DNMT3L : stimulation de DNMT3A pour la méthylation dCas9 : fonction nucléase désactivée, pour lier l'ARNg et la protéine effectrice HA : tag de reconnaissance par des anticorps anti HA (purification des protéines) NLS : séquence d'adressage des protéines au noyau KRAB : domaine de répression transcriptionnelle	Plasmid #167981	Ampicilline	BFP
CrisprOff v2.1 + promoteur T7	11 908 pb	Promoteur T7 : initiation de la transcription in vitro Le reste est identique	Plasmide maison	Ampicilline	BFP
pEF1a-mcherry-gRNA + ARNg GLUT2, GCG, MC4R ou CCK	5 391 pb	Séquence ARNg GLUT2, GCG, MC4R, CCK : Guide pour dCas9 Séquence des ARNg insérée dans le plasmide par des membres de l'équipe	Plasmid #100958	Ampicilline	mCherry
LLP185 pLVP-dCas9-DNM T3A V2	12 934 pb	dCas9 : fonction nucléase désactivée, pour lier l'ARNg et la protéine effectrice DNMT3A : méthylation des régions cibles	Plasmid #100936	Puromycine Ampicilline	Aucun
Nom ARNm		Séquences d'intérêt			Gène marqueur
ARNm Tomato		Tomato			Tomato
ARNm mCherry		mCherry			mCherry

GFP : Fluorescence verte; BFP : Fluorescence bleue; mCherry et Tomato : Fluorescence rouge

Extraction ADN et ARN

Le kit NucleoSpin TriPrep et le protocole fournisseur ont été utilisés

RT

Une quantité de 500 ng d'ARN totaux dilués dans 10 µL d'eau ont été déposés dans chaque puits d'une plaque 96 puits, puis 1 µL d'oligos dT (100 µM) et 1 µL de dNTPs (10 mM) ont été ajoutés; après une incubation de 5 minutes à 65°C, puis 2 minutes à 42°C, 4µL de First Strand Buffer 5X, 2 µL de DTT 0.1M, 1µL de Rnasine et 1µL d'enzyme InvitroGen SuperScript II ont été ajoutés dans chaque puits, la plaque a ensuite été mise à incuber 60 minutes à 42°C, puis 15 minutes à 70°C pour inactiver l'enzyme. Les ADNc ont ensuite été dilués au 1/2 dans de l'eau.

Amorce RT : (dT)₁₅ 100µM

qPCR

Dans chaque puits d'une plaque 384 puits, 2.5 µL de SYBR Green PCR MasterMix 2X, 0.25µL d'amorces Forward et Reverse du gène étudié, et 0.5µL d'eau ont été mélangés; 1.5µL d'ADNc ont ensuite été ajoutés dans chaque puits.

Cycle de qPCR : 42 cycles; dénaturation à 95°C pendant 15 secondes, hybridation et élongation à 58°C pendant 1 minute

Amorces qPCR :

- GLUT2 : F : ATCAGCCAACCTGTTTACGC R : TTTCAAAGAACTGACAAAGAGG
- GCG : F : TCTTATTTGGAAGGCCAAGC R : TCTGAGAAGGAGCCATCAGC
- MC4R : F : ATATGCTGGTGAGCGTTTCC R : GCAAATTGAGGCGAGTAAGG
- CCK : F : AAAAGGTAGACGGCGAGTCC R : CCCGGTCACTTATTCTGTGG
- SGLT1 : F : TTTTGGGGACTGGTCATAGG R : CACATCTGGAATGGGCTTG

Traitement bisulfite sur les ADN extraits

Le kit EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research) a été utilisé selon le protocole

fournisseur.

Pyromark

Utilisation du kit Qiagen et du protocole associé

Amorces Pyromark :

SGLT1 :

- F : TAGTTTTTTTTTTTTTATAGTGGGGGTTA
- R : ATTACAAAAATCAACCAAAATCTTAATCT
- S : TTTGGGAGTTGTAGG

GLUT2 :

- F : GATGGATTTAGTTTTTGGAGAATTGATA
- R : ATAACCCCATCCCAATAAC
- S : TTTTTTTAGAGTTTTTTGAAGAGT

GCG :

- F : AGTGTGGTTTAAGGATTAGTATT
- R : CCAAAAAAAAAAACAATTTATTACATATT
- S : TGTTTTTTATTAGTAGAGGGG

Les amorces Forward et Reverse permettent l'amplification de l'ADN biotinylé, et l'amorce S permet d'initier le séquençage, et est située peu après l'amorce F.

Migration sur gel

Du tampon Tris, Acétate, EDTA (TAE) a été mélangé à 0.8-2% agarose (selon la taille du fragment à faire migrer), la solution a ensuite été homogénéisée au micro-ondes, puis 2 ou 4 µL de marqueur Gel Red ont été ajoutés (selon le volume); après polymérisation, le gel a été déposé dans la cuve de migration contenant du TAE. Le mix ADN + rouge de crésol a été ajouté dans les puits, tout comme le marqueur de taille 100 pb ou 10 Kb dans les puits dédiés. La tension de migration était de 100 V, durée variable selon la taille du fragment. La visualisation des résultats sur gel a ensuite été réalisée aux UV.

Obtention de l'ARN CrisprOff :

Des bactéries transformées avec le plasmide CrisprOff ont été étalées dans une boîte de pétri contenant un fond de LB + Ampicilline afin d'isoler les clones, puis mises en culture. Le plasmide CrisprOff a été extrait avec le kit Macherey Nagel. Le fragment de 7kb d'intérêt permettant la transcription in vitro a été amplifié par PCR avec la Taq Eurobio, puis purifié avec NucleoSpin Gel. Il restera ensuite à réaliser la transcription in vitro.

En parallèle, l'insertion du promoteur T7 dans CrisprOff a été réalisée, puis le plasmide a été amplifié par culture bactérienne; il a ensuite été extrait sous forme de CrisprOff+T7 après sélection des bactéries par le kit nucleobond; les plasmides CrisprOff et CrisprOff+T7 ont ensuite été séquencés par Plasmidosaurus, afin de vérifier l'insertion du promoteur T7, ce qui a été confirmé. La tentative de transcription in vitro n'a pas montré de grande réussite, malgré plusieurs tentatives.

Transcription in vitro

Le kit NEB [HiScribe™ T7 ARCA mRNA Kit \(with tailing\) | NEB](#) a été utilisé selon le protocole fournisseur.

PCR de la séquence d'intérêt de CrisprOff, codant pour notre ARNm permettant la méthylation spécifique des promoteurs des gènes cibles

Amorces : F : TAATACGACTCACTATAGGGCGTGCTGGTTATTGTGCTGT ou
TAATACGACTCACTATAGGGAGAATTCTGCAGTCGACGGTA
R : TAGCCAACCTTTGTTCATGG

Insertion du promoteur T7 dans CrisprOff, pour favoriser la fixation de la T7 polymérase du kit Hiscribe et la transcription in vitro de notre matrice ADN

Amorce F :

TCATCATTTTGGCAAAGAATTTAATACGACTCACTATAGGGAATTCTGCAGTCGACGGTAC

Amorce R :

GTACCGTCGACTGCAGAATTCCTATAGTGAGTCGTATTAAATTCTTTGCCAAAATGATGA

Séquences des ARNg insérés dans le plasmide pEF1a :

GCG : GATTCCCAGGCAACTCATAT GGG

MC4R : CAGAAGCGTGTAGAATCAGG AGG

CCK : AGATGACTGGCCGACGGCTC AGG

GLUT2 : ATGTCCTTGAGTGCAGTAGTG GGG

Analyses statistiques réalisées avec GraphPad Prism, avec des expressions mesurées par quantification relative +/- Erreur standard à la moyenne.

Différences entre les groupes quantifiées avec One-way ANOVA avec post-test Tuckey pour les comparaisons multiples. Significativité * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$.

Résultats

I) Transfection des IPEC

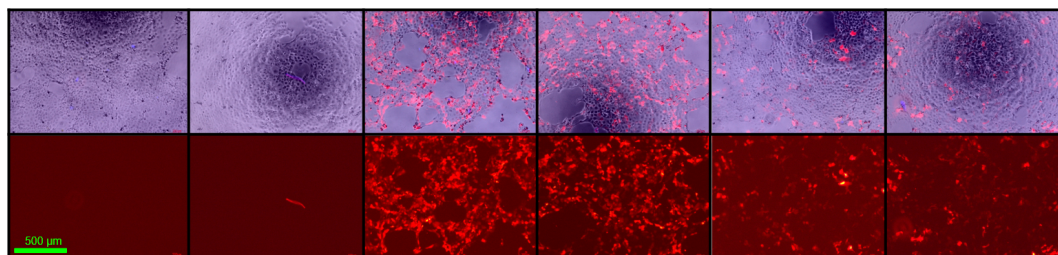
1) Efficacité lors de la transfection ADN/ARN des lignées

A) Comparaison de l'efficacité de transfection : Opti-MEM vs DMEM-F12

Nous avons comparé les efficacités de transfection de deux milieux de culture sur deux lignées intestinales porcines (IPEC-1, issues de l'iléon, et IPEC-J2, issues du duodénum) : DMEM-F12, milieu de transfection identique à celui de culture des lignées cellulaires classiques, et l'Opti-MEM, un milieu de culture réduit en sérum développé spécifiquement dans le but d'améliorer les taux de transfection des cellules. Pour cela, nous avons comparé des transfections ARN (ARNm Tomato) et ADN (plasmide pEF1a-mCherry-ARNg-GLUT2 permettant d'exprimer une fluorescence rouge dans les cellules transfectées et CrisprOff, exprimant pour sa part une fluorescence bleue) aux cellules non transfectées, avec différents réactifs de transfection : ICAfectin ARN (pour les transfections ARN) ou FuGENE (transfection ADN), puis nous avons mesuré 48h après transfection l'expression des plasmides et ARNm par la fluorescence en comparaison aux conditions non transfectées. La fluorescence bleue a été observée, mais à des niveaux trop faibles pour comparer les conditions, en comparaison à la fluorescence rouge.

ICAfectin ARN Tomato	-	-	+	+	-	-
FuGENE CrisprOff + pEF1a-mCherry-GLUT2	-	-	-	-	+	+
Opti-MEM	+	-	+	-	+	-
DMEM-F12	-	+	-	+	-	+

A



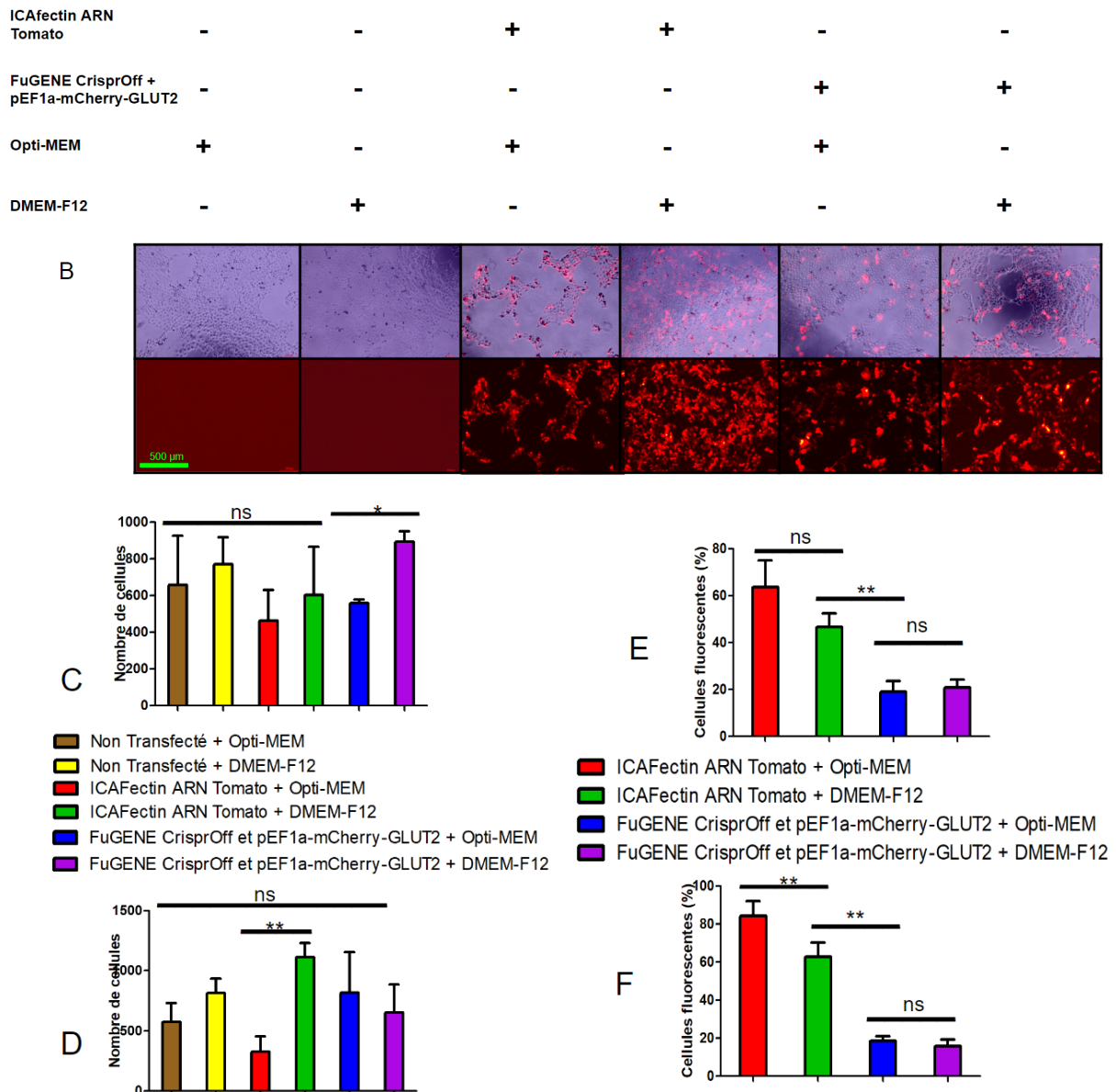


Figure 1:
A et B: Images de la fluorescence dans les différentes conditions avec deux milieux de transfection différents (Opti-MEM ou DMEM-F12) et 2 types de matériel transfecté (ARNm Tomato ou pEF1a-mCherry-GLUT2 + CrisprOff) des IPEC-1 (A) et des IPEC-J2 (B). C et D: Comptage du nombre de cellules dans chaque condition après transfection des IPEC-1 (C) et des IPEC-J2 (D). E et F: Quantification du taux de transfection par mesure du nombre de cellules fluorescentes selon le milieu de transfection (Opti-MEM ou DMEM-F12) et selon le matériel transfecté (ARNm ou plasmide) des IPEC-1 (E) et des IPEC-J2 (F). n=3 pour toutes les conditions; **p<0.01; *p<0.05

La fluorescence sur les photos permet d'observer une très nette différence entre les transfections ARN et non transfectées. Pour les transfections ADN, la fluorescence globale semble être moins intense que pour les ARNm. A noter, la fluorescence bleue était absente dans toutes les conditions, ou alors il s'agissait de bruit de fond. L'analyse des photos semble démontrer plusieurs effets : tout d'abord, l'efficacité de transfection de l'ARNm avec l'Opti-MEM est plus importante qu'avec le DMEM-F12, avec une augmentation du nombre de cellules transfectées de l'ordre de 40% (46% vs 63% de cellules transfectées), mais ce dernier favoriserait davantage la survie cellulaire, avec une augmentation de l'ordre de 35% de la survie des cellules. Pour les transfections ADN, la différence des taux de transfection

n'est pas très importante, avec des pourcentages de transfection de l'ordre de 20% chez les deux lignées, et avec les deux milieux. Par contre, la différence de survie cellulaire est encore plus importante : le DMEM-F12 permet la survie de près de 70% de cellules de plus en comparaison à l'Opti-MEM, avec des taux de survie proches des conditions non transfectées. En conclusion, on peut donc dire que malgré une efficacité de transfection plus importante pour les ARNm, l'utilisation de l'Opti-MEM lors de la transfection semble causer une augmentation de la mortalité cellulaire.

B) Sélection des lignées transfectées par l'ajout de puromycine

Afin de pouvoir obtenir un taux de cellules transfectées plus important par l'élimination des cellules non transfectées, nous avons essayé de réaliser une sélection des cellules des lignées transfectées. Pour cela, nous avons utilisé la co-transfection dans nos lignées cellulaires avec le transfectant FuGENE en utilisant un autre plasmide, LLP185 pLVP-dCas9-DNMT3A V2, qui contient un gène de résistance à la puromycine, associé à pEF1a-mCherry-ARNg-GLUT2. La co-transfection permet non seulement de conférer la résistance à la puromycine avec LLP185, mais également de marquer les cellules transfectées avec la fluorescence exprimée par pEF1a. Nous avons ensuite ajouté ou pas de la puromycine à une concentration de 3 µg/ml (dose minimale tuant les cellules non transfectées, d'après un test préliminaire que nous avons réalisé) dans les milieux, deux jours après transfection, afin d'éliminer les cellules non transfectées et de garder les cellules transfectées en vie; les observations ont été réalisées 24h après l'ajout de la puromycine.

FuGENE LLP 185 +
pEF1a-mCherry-GLUT2

-

-

+

+

Puromycine 3 µg/ml

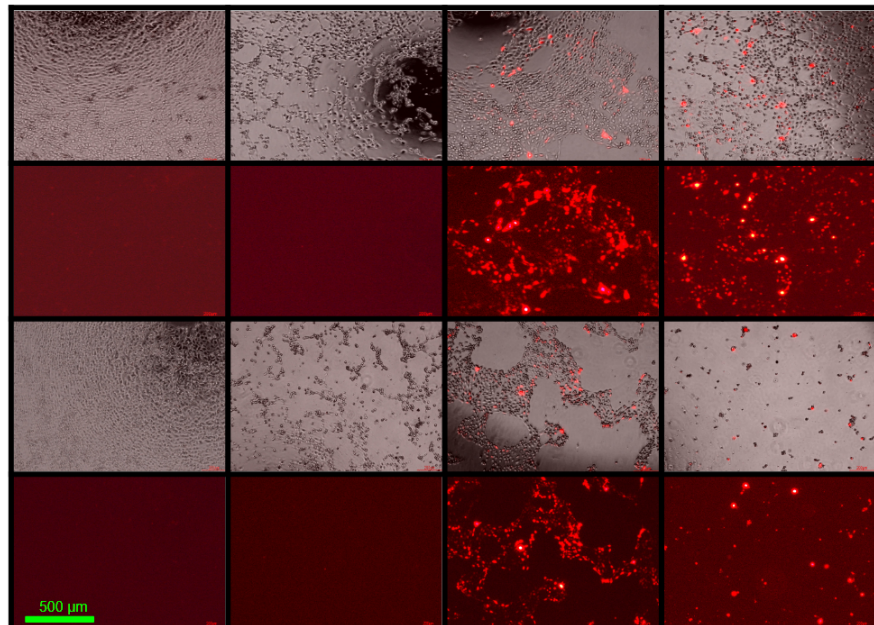
-

+

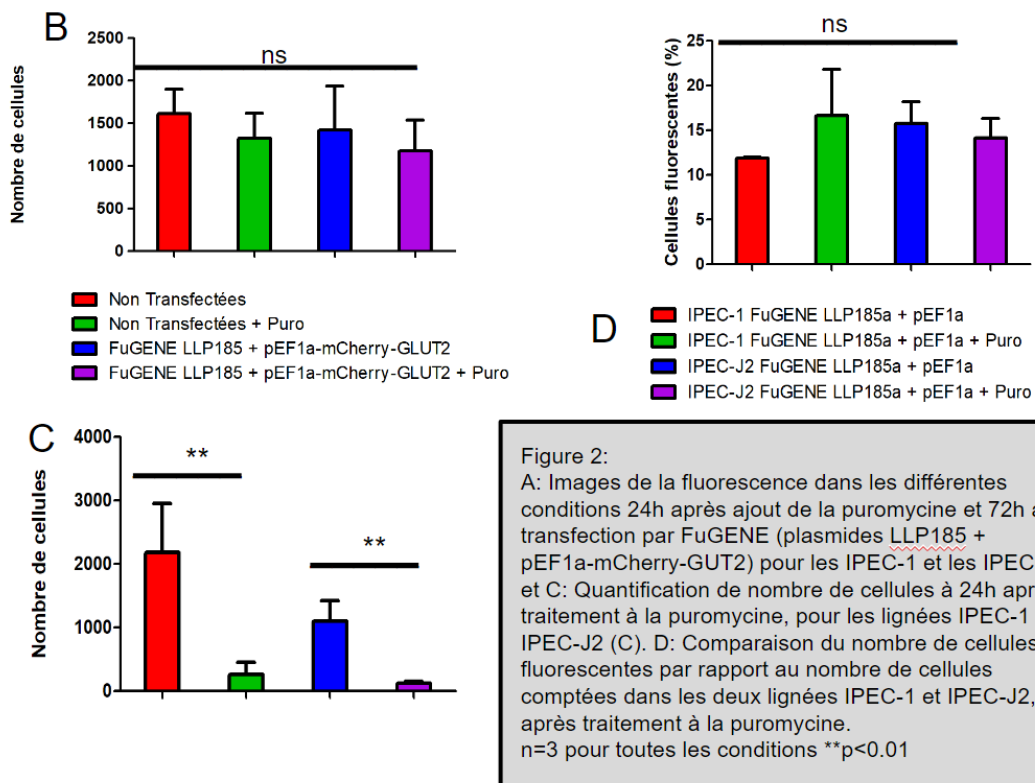
-

+

IPEC-1



A



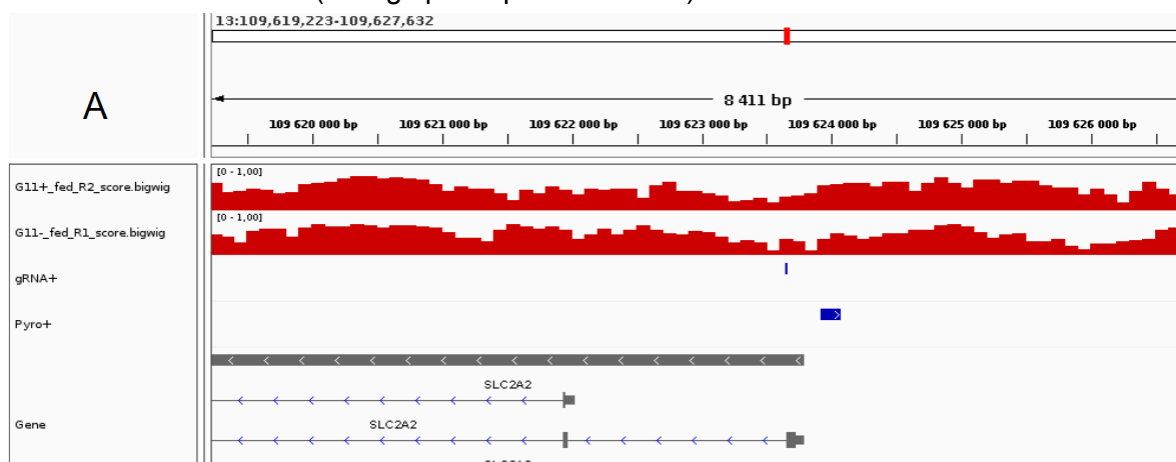
L'ajout de la puromycine, réalisé 24h avant les observations, a permis d'éliminer une grande partie des cellules, de manière bien plus prononcée chez les IPEC-J2, cela étant observable par la forme des cellules qui deviennent rondes une fois mortes (décolage du support). La transfection ne semble pas particulièrement permettre la survie des cellules, même s'il est compliqué de le confirmer, de part le faible nombre de cellules transfectées. La proportion de cellules survivantes dans les conditions transfectées par rapport aux non-transfectées est de l'ordre de 10%, mais la proportion de cellules transfectées parmi celles-ci n'augmente pas en proportion (toujours entre 10 et 15% du total des cellules environ). Les taux de cellules transfectées n'ont donc pas été augmentés suite à l'ajout de puromycine. Cela pourrait être dû à une trop forte concentration de puromycine qui aurait été fatale même aux cellules transfectées, la transfection causant déjà une mortalité cellulaire variable selon les lignées, même si moins importante que pour la puromycine; il est également possible que cela soit dû à une faible intégration des plasmides, avec des cellules qui ne peuvent donc pas y résister.

2) Edition de l'épigénome par l'utilisation de transfection ADN

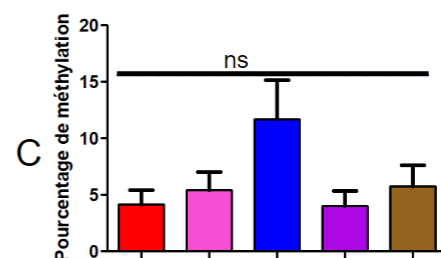
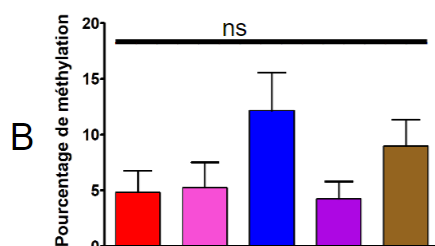
A) Mesure des taux de méthylation des gènes cibles par pyromark

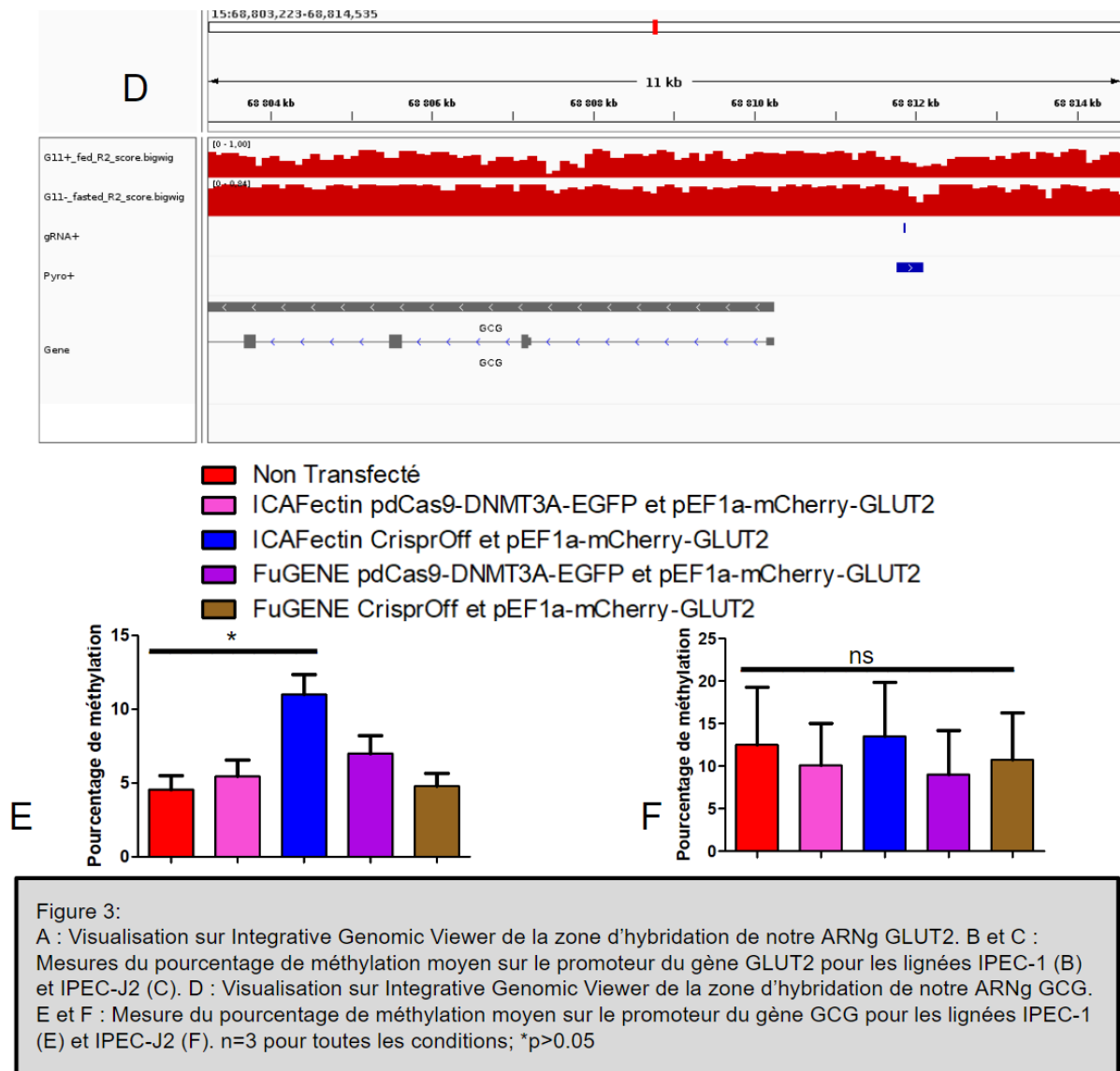
L'édition de l'épigénome est une nouvelle approche permettant la modification de marques épigénétiques sur une région du génome, dans le but d'augmenter ou de diminuer l'expression de certains gènes, et d'en étudier la régulation et/ou la fonction. Dans notre étude, nous souhaitons augmenter la méthylation du promoteur de gènes impliqués dans la physiologie digestive. Nous avons donc comparé l'efficacité de modification de l'épigénome par deux plasmides: le premier, pdCas9-DNMT3A-EGFP, contenant un système de ciblage CRISPR dont la nucléase Cas9 est inactivée (dCas9) et couplée à une enzyme de

méthylation de l'ADN (DNMT3A) et le second, CrisprOff, possédant en plus une séquence DNMT3L (stimulation de l'activité DNMT3A) et KRAB (répression transcriptionnelle). Chacun des deux plasmides a été co-transfecté avec pEF1a-mCherry-ARNg-GLUT2, qui contient la séquence codant l'ARNg ciblant la région promotrice de *GLUT2*, un gène codant pour un transporteur transmembranaire au glucose, et permet donc aux protéines codées par nos deux premiers plasmides de méthyler spécifiquement les régions promotrices de ce gène, dans les lignées IPEC-1 et IPEC-J2, dans le but de réprimer sa transcription. Suite à cette transfection, la fluorescence était suffisante afin de permettre pour réaliser une extraction de l'ADN de ces cellules, puis nous avons réalisé un traitement bisulfite suivi d'un séquençage pyromark, qui permet de mesurer la méthylation des îlots CpG afin de déterminer le taux de méthylation moyen sur certains sites spécifiques au niveau du promoteur, pour mesurer la variation de méthylation suivant les différentes conditions. Nous avons comparé ces taux de méthylation du promoteur de *GLUT2* à ceux de *GCG*, dont la méthylation ne devrait pas varier entre les conditions (ARNg spécifique de *GLUT2*).



- Non Transfecté
- ICAFectin pdCas9-DNMT3A-EGFP et pEF1a-mCherry-GLUT2
- ICAFectin CrisprOff et pEF1a-mCherry-GLUT2
- FuGENE pdCas9-DNMT3A-EGFP et pEF1a-mCherry-GLUT2
- FuGENE CrisprOff et pEF1a-mCherry-GLUT2





Suite à ces transfections, la méthylation des différents sites du promoteur GLUT2 semble varier entre les conditions; en particulier, la méthylation moyenne des transfections par CrisprOff via ICAfectin ou FuGENE est plus élevée que pour les autres conditions (respectivement de 12 et 9 % par rapport à 5% dans la condition non transfecté) pour les IPEC-1, et de manière similaire pour ICAfectin dans les IPEC-J2, mais le manque de réplicats, en particulier pour FuGENE, ne permet pas de déterminer si la méthylation est reproductible. Pour le gène GCG, qui nous sert de contrôle, la variation entre les conditions est importante; pour la transfection ICAfectin CrisprOff en particulier, on observe une augmentation moyenne de 7% de la méthylation avec la transfection par rapport au contrôle, mais les autres conditions sont davantage reproductibles. Il est donc difficile de conclure à une méthylation spécifique par CrisprOff de GLUT2. A côté de CrisprOff, le plasmide pdCas9-DNMT3A-EGFP ne semble pas affecter de manière remarquable la méthylation de GLUT2 ou du génome, avec des mesures de méthylation pour GLUT2 et GCG similaires au non transfecté, quelque soit le réactif de transfection utilisé.

Une des pistes pour expliquer une méthylation non spécifique serait la transfection de CrisprOff ou pdCas9-DNMT3A-EGFP sans pEF1a dans certaines cellules, ce qui conduirait à la production du complexe d'édition du génome provoquant une méthylation globale du génome. Également, l'absence de différence significative pour certaines conditions peut

s'expliquer par le fait que l'extraction a été réalisée sur toutes les cellules, en incluant les non transfectées, ce qui lisse les différences de méthylation observées. Pour compléter ces résultats, nous avons essayé de mesurer la méthylation de SGLT1, mais cela n'a pas fonctionné.

B) Quantification des quantités d'ARNm par RT-qPCR après transfection ADN

Nous avons également mesuré les variations d'expression de GLUT2, SGLT1 et HPRT sous la forme d'une RT-qPCR de leur ARNm respectifs provenant des extractions des lignées transfectées, afin d'évaluer si la modification de méthylation de GLUT2 avait également une influence sur la quantité de leurs ARNm. L'estimation des expressions de GLUT2 et de SGLT1 sont normalisées par l'expression de HPRT, notre gène contrôle. Nous espérons une baisse de la transcription de GLUT2, et pas de modification de celle de SGLT1.

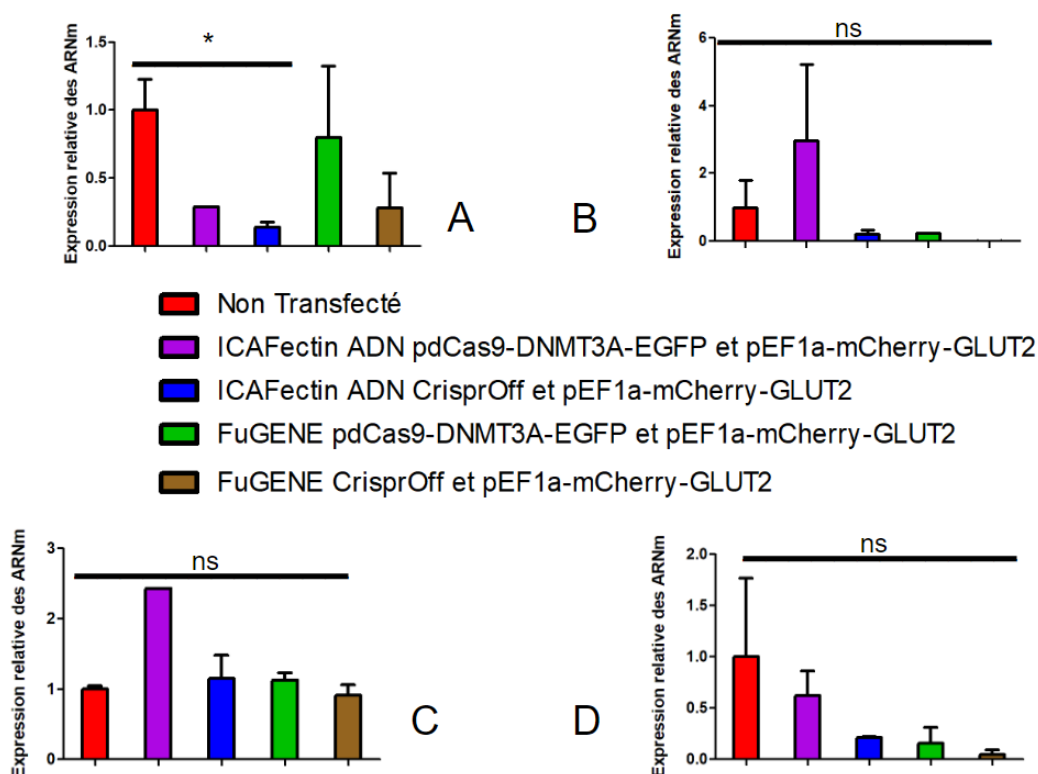


Figure 4:

A et B: Mesure de la quantité relative des ARNm de GLUT2, normalisée par HPRT, dans les lignées IPEC-1(A) et IPEC-J2 (B), des conditions contrôle par rapport aux transfectées. C et D : Mesure de l'expression relative des ARNm de SGLT1, normalisée par HPRT, dans les lignées IPEC-1 (C) et IPEC-J2 (D), des conditions contrôle par rapport aux transfectées. n= 3 sauf pour ICAfectin ADN pdCas9-DNMT3A-EGFP et pEF1a-mCherry-GLUT2 (n=1) *p<0.05

Pour la lignée IPEC-1, il semble se produire une diminution de l'expression de GLUT2 dans toutes les conditions, ce qui confirmerait bien que la méthylation exercée par CrisprOff permet de diminuer efficacement l'expression de ce gène. Également, à l'exception de la condition ICAfectin GFP, les expressions de SGLT1 semblent rester constantes, ce qui confirmerait un effet ciblé sur l'expression de GLUT2.

Pour la lignée IPEC-J2, les résultats sont moins évidents, certaines conditions (ICAF GFP) montrant une augmentation globale des niveaux des ARNm, alors que toutes les autres

conditions vont dans le sens d'une diminution des expressions des ARNm à la fois de GLUT2 et de SGLT1, ce qui n'est pas attendu pour ce dernier, et qui pourrait traduire un défaut de ciblage efficace.

C) Comparaison de la quantité des ARNm de GLUT2 et de GCG après transfection par CrisprOff associé à des plasmides codants des ARNg

Le région de ciblage de CrisprOff étant dépendante des ARNg avec lesquels il est co-transfecté, nous avons essayé de cibler dans nos lignées IPEC-1 et IPEC-J2 d'autres gènes potentiellement impliqués dans le fonctionnement des cellules digestives, en complément de GLUT2; ici, seul les résultats de GLUT2 et GCG sont présentés. Cela avait pour but de déterminer si les observations réalisées pour GLUT2 étaient reproductibles, mais également de vérifier que CrisprOff permettait de méthyliser spécifiquement d'autres cibles, et si cela influait sur l'expression de leurs ARNm. Les gènes de ménage que nous avons utilisés étaient HPRT et B2M. Nous avons pour cette transfection utilisé le réactif de transfection FuGENE dans l'Opti-MEM, ainsi que les plasmides CrisprOff et différentes versions du plasmide pEF1a-mCherry-ARNg (GLUT2, GCG, MC4R ou CCK), contenant chacun les séquences des ARNg associés. Nous avons donc réalisé une quantification des ARNm par RT-qPCR pour les gènes GLUT2, GCG, MC4R et CCK, mais les résultats d'expression de MC4R et CCK ne sont pas présentés car trop faibles.

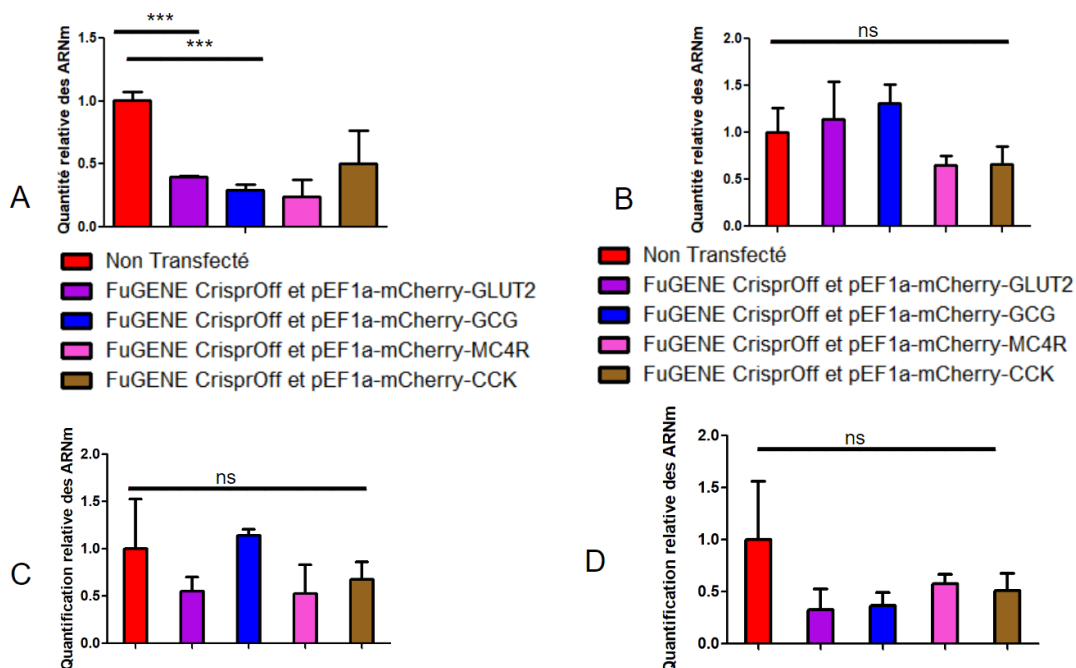


Figure 5:

A et B : Mesure de la quantité relative des ARNm par RT-qPCR de GLUT2, normalisée par HPRT et B2M, dans les lignées IPEC-1(A) et IPEC-J2 (B) après transfection, par rapport aux non transfectées. C et D : Mesure de l'expression relative des ARNm par RT-qPCR de GCG, normalisée par HPRT et B2M, dans les lignées IPEC-1 (C) et IPEC-J2 (D) après transfection, par rapport aux non transfectées. n=3 pour toutes les conditions ***p<0.001

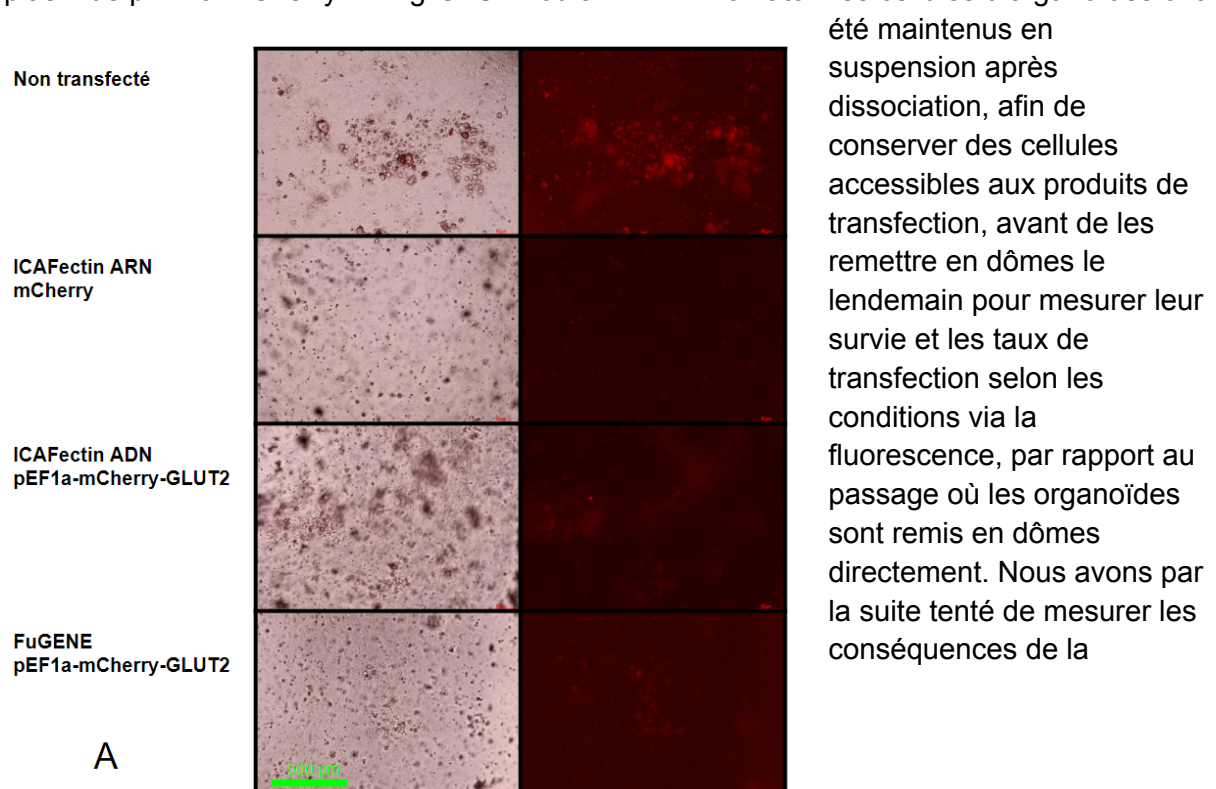
Pour la lignée IPEC-1, les résultats semblent indiquer que l'on induit une diminution de la quantité des ARNm de GLUT2 et GCG avec la transfection, mais non spécifique aux gènes ciblés dans les deux conditions, sauf pour la transfection avec le plasmide codant l'ARNg de GCG, avec une conservation des niveaux d'ARNm de GCG. De même, il semble y avoir des

résultats similaires pour les IPEC-J2, à l'exception des quantités d'ARNm de GLUT2 pour les transfections des plasmides ciblant GLUT2 et GCG. Cette absence de spécificité peut s'expliquer par plusieurs facteurs: un ciblage par les ARNg pourrait entraîner l'apoptose des cellules si ceux-ci ne peuvent plus être transcrits, ce qui aurait tendance à favoriser les cellules transfectées seulement par CrisprOff, qui possèdent donc une méthylation globale des gènes par la protéine non ciblée, ce qui semble être le cas pour toutes les conditions. Il est également envisageable que la transfection n'ait pas l'impact attendu sur le gène, mais la quantité des ARNm de GLUT2 et de GCG semble diminuer de manière globale après transfection, donc cela paraît peu probable. La production d'un ARNm de CrisprOff pourrait permettre d'observer des résultats plus significatifs, mais le ciblage par les ARNg pourrait également être une cause de la non-spécificité de la méthylation. Pour compléter ces résultats, nous réalisons le séquençage des promoteurs des gènes cibles après traitement bisulfite des ADN afin de déterminer les niveaux de méthylation de ceux-ci.

II) Transfection d'organoïdes

1) Impact de la durée de transfection sur la survie des organoïdes

Les dômes de matrigel dans lesquels sont cultivés les organoïdes peuvent limiter l'accessibilité de nos mix de transfection à nos cellules, non seulement à la périphérie des organoïdes mais encore davantage aux cellules du centre. De plus, la formation des organoïdes provoque l'internalisation des parties apicales responsables de l'absorption, au profit des parties basales des cellules. Ces deux raisons empêchant de réaliser des transfections de manière simple, nous avons d'abord évalué les protocoles de transfection utilisés dans la littérature (Zhang H, 2022, Together is Better: mRNA Co-Encapsulation in Lipoplexes is Required to Obtain Ratiometric Co-Delivery and Protein Expression on the Single Cell Level. *Adv Sci* 9(4):2102072), qui consistaient à dissocier les organoïdes de leur matrigel, puis de réaliser les transfections avec des cellules isolées en suspension en ajoutant les mix de transfection, d'attendre des durées variables (4h ou toute une nuit), avant de les remettre en dômes pour mesurer les taux de transfection. Nous avons utilisé un milieu de DMEM-F12, les transfectants ICAfectin ARN, ADN, et FuGENE, associés au plasmide pEF1a-mCherry-ARNg-GLUT2 ou à l'ARNm Tomato. Les cellules d'organoïdes ont

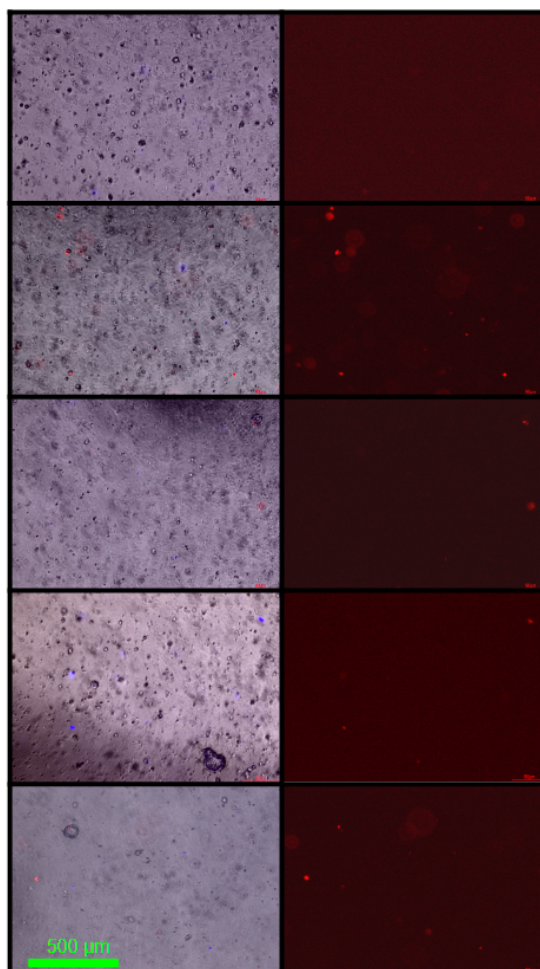


Non transfecté

ICAFectin ARN mCherry

ICAFectin ADN CrisprOff +
pEF1a-mCherry-GLUT2FuGENE CrisprOff +
pEF1a-mCherry-GLUT2Lipofectamine 3000 CrisprOff
+ pEF1a-mCherry-GLUT2

B



conservation des organoïdes en suspension, en diminuant la durée durant laquelle les cellules étaient conservées hors des dômes. En complément de cela, nous avons centrifugé les cellules plus longtemps (1h au lieu de 5 minutes) de manière à augmenter l'efficacité de transfection, et compenser la diminution de durée en suspension à 3 ou 4h par rapport à toute la nuit précédemment. Nous avons

C	Transfection longue	Transfection courte	Figure 6: A: Organoïdes colon après transfection, par des ARNm ou des plasmides, après transfection longue B: Organoïdes colon après transfection par des ARNm ou des plasmides, après transfection courte C: Estimation des taux de survie et de transfection des organoïdes transfectés à 48h après transfection
	Densité	15%	20%
	Mortalité	20%	5%
	Taux de transfection	10%	10%

également changé le milieu de transfection, en remplaçant le DMEM-F12 par de l'Opti-MEM. Enfin, nous avons ajouté à notre comparatif le réactif de transfection Lipofectamine3000, afin de déterminer s'il augmentait les taux de transfection en comparaison aux 2 autres. Les observations des résultats ont été réalisées 48h après transfection.

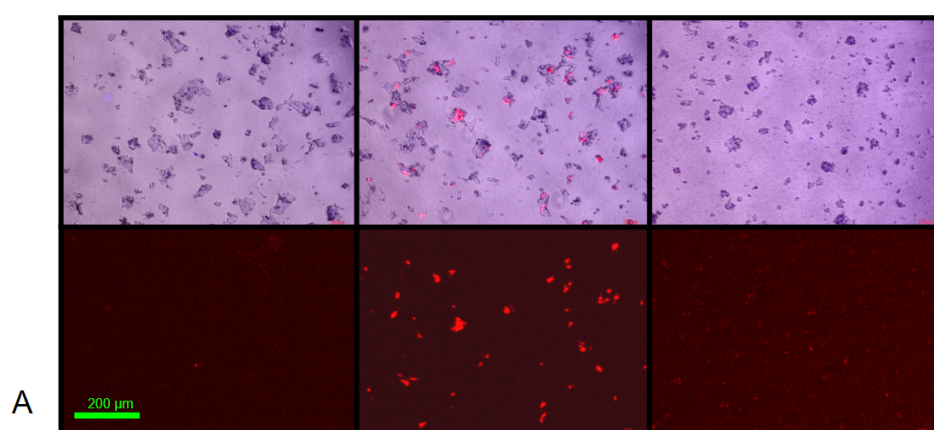
En termes de résultats, nous avons observé lors de la première expérience une forte mortalité de ces cellules, associée à des faibles taux de transfection. La seconde expérience a permis de réduire fortement la mortalité des cellules, ce qui pourrait être un signe que les cellules isolées d'organoïdes déclenchent une apoptose en cas de manque de contact avec

d'autres cellules ou le matrigel. Au niveau de la fluorescence, celle-ci n'a pas augmenté de manière importante, malgré l'augmentation de survie des cellules. On peut noter que les différents réactifs de transfection ADN donnent des résultats similaires, mais toujours inférieurs à ceux de l'ICAFectin ARN.

2) Utilisation d'un protocole de transfection en monocouche

Notre approche suivante a ciblé la modification du support des organoïdes pendant la transfection : nous avons tenté de fournir une matrice à nos cellules, pour leur permettre de se fixer, tout en conservant une grande accessibilité pour nos transfectants; cela pourrait avoir pour conséquence de limiter l'apoptose de nos cellules observée chez les cellules isolées et sans support (parler des taux de survie/transfection selon la densité cellulaire, si réalisé pour les organoïdes et en 2D), mais également de les orienter avec la partie apicale en haut, et donc leur partie absorbative. Cela permet dans l'idée d'augmenter l'absorption de transfectant par les cellules, celles-ci n'étant plus abritées par le matrigel. Nous avons réalisé un passage des organoïdes dans une plaque ayant au préalable contenu du matrigel dilué dans du PBS froid, afin de déposer un fond de matrigel au fond des puits, et leur permettre de se fixer et continuer à proliférer.

ICAFectin ARN mCherry	-	+	-
ICAFectin ADN CrisprOff + pEF1a-mCherry-GLUT2	-	-	+



Taux de fluorescence suite à la transfection sur matrice 2D des organoïdes de colon

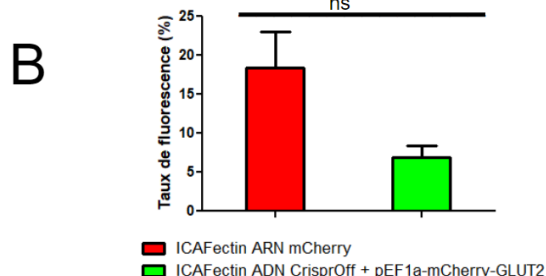


Figure 7:

A: Organoïdes colon après transfection par des ARNm ou des plasmides, après transfection sur matrice 2D.
B: Quantification des taux de transfection des organoïdes sur matrice 2D.
n=3 pour toutes les conditions

Cette expérience nous a permis d'augmenter le taux de transfection, ou du moins de mieux apprécier le pourcentage de cellules transfectées, de l'ordre de 20% pour la condition ICAFectin ARN et 10% pour ICAFectin ADN; la transfection sur matrice 2D permet donc de conserver des densités élevées et une faible mortalité par rapport à la transfection des cellules en suspension, en particulier pour les transfections ARNm.

3) Remise en dôme 3D après transfection en monocouche

Après avoir réalisé nos transfections en monocouche, nous avons voulu vérifier la survie à long terme des organoïdes, et ainsi déterminer si ces organoïdes pouvaient continuer à proliférer, mais également étudier l'impact de la densité sur les taux de transfection. Nous avons donc à nouveau réalisé une transfection en 2D sur des organoïdes d'iléon à une densité plus élevée que pour l'expérience précédente, nous avons ensuite transféré les cellules de la matrice 2D transfectées dans des dômes de matrigel, 5 jours après transfection.

ICAFectin ARN mCherry

-

+

-

ICAFectin ADN CrisprOff +
pEF1a-mCherry-GLUT2

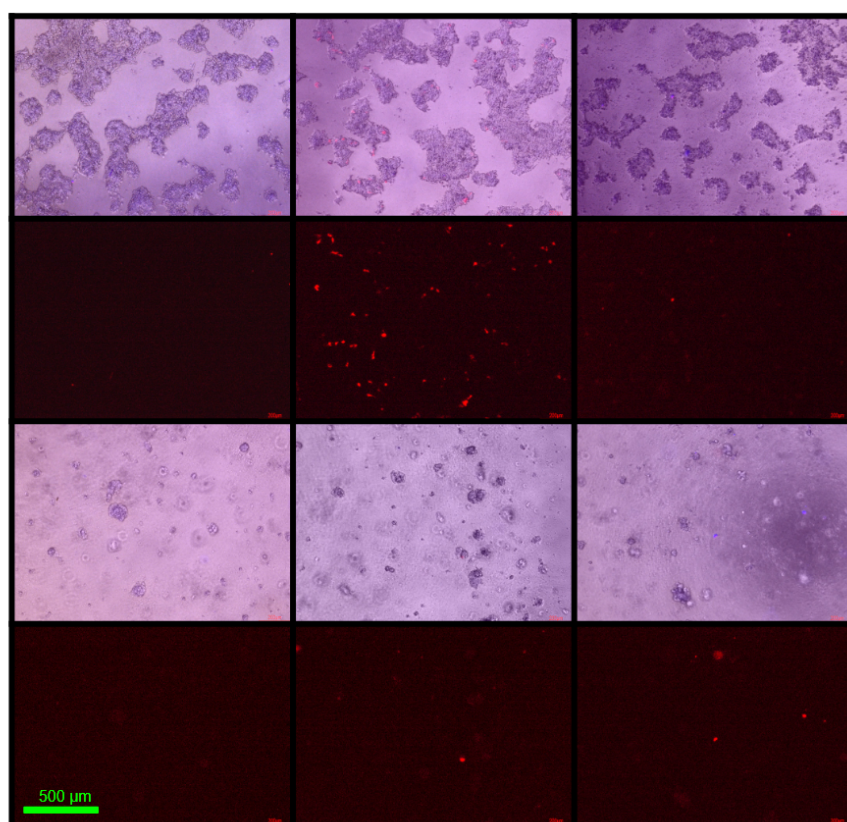
-

-

+

Organoïdes en 2D

Organoïdes en 3D



B			
	Organoïdes transfectés sur matrice 2D, faible densité	Organoïdes transfectés sur matrice 2D, forte densité	Organoïdes remis en 3D
Densité	15%	50%	30%
Mortalité	5%	5%	2%
Taux de transfection	15%	15%	5%

Figure 8:

A: Organoïdes iléon après transfection sur matrice 2D par des ARNm ou des plasmides. B: Estimation des taux de survie, de transfection et de mortalité des organoïdes transfectés avant et après remise en dôme.

Les résultats de transfection sont similaires à ceux de l'expérience précédente, pour les transfusions de plasmides et d'ARNm. Après la remise en dôme, certaines cellules semblent continuer à se diviser, mais il ne nous a pas été possible de déterminer si la proportion de cellules transfectées avait augmenté en comparaison aux expériences précédentes. Même si la densité est légèrement plus importante, la proportion de cellules qui forment un organoïde est beaucoup plus élevée, ce qui est le signe que les cellules d'organoïdes isolées remises en dômes après transfection en 2D ont davantage tendance à reformer des organoïdes complets qu'après transfection en suspension, et donc à survivre.

4) Transcription in vitro et piste d'amélioration utilisée

Ayant constaté des efficacités de transfection ARNm bien supérieures à celles observées par la transfection de plasmides, un des objectifs était de produire l'ARNm de CrisprOff par transcription in vitro, afin de réaliser des transfusions sur nos lignées et nos organoïdes et ainsi modifier plus efficacement leur méthylome. Nous avons donc travaillé en parallèle à la production de cet ARNm. Après avoir tenté sans succès la transcription in vitro sur le plasmide, nous avons décidé d'introduire la séquence promotrice de la transcriptase virale T7 (l'enzyme contenue dans le kit de transcription in vitro) en amont de la séquence codante du plasmide CRISPRoff. Pour cela, nous avons utilisé deux approches différentes: une approche in vitro, avec digestion du plasmide et introduction de la séquence promotrice avec un fragment double brin capable de d'hybrider au milieu du plasmide clivé, mais également le clonage de la séquence T7 dans le plasmide avant de le cultiver dans des bactéries compétentes, et de l'extraire à nouveau. C'est finalement cette approche qui a permis d'introduire le promoteur de la T7. Cela devrait permettre de favoriser la transcription in vitro, suite aux difficultés à transcrire le CrisprOff "sauvage".

Discussion

La remplacement des organismes par des systèmes plus réduits tels que les cultures cellulaires et les organoïdes sera accélérée par une modification facilitée et durable de l'expression de ces cellules, par exemple en les transfectant afin de pouvoir les adapter selon des critères spécifiques. Ici, nous avons donc travaillé à faciliter ces modifications d'expressions, en jouant sur différents paramètres lors de la transfection de cellules. Pour les lignées cellulaires (IPEC-1 et IPEC-J2), nous pouvons noter plusieurs points intéressants; au cours de nos transfusions, le changement entre Opti-MEM et DMEM-F12 n'a pas semblé montrer de différence significative concernant les taux de transfection. Au contraire, la transfection des ARNm en lieu et place des ADN semble montrer une forte augmentation du taux de transfection. De plus, la sélection des cellules transfectées par un plasmide conférant la résistance à la puromycine semble prometteur; il serait envisageable de réaliser une transfection d'un ARNm codant le gène de résistance à la puromycine associé par un domaine auto clivant à un ensemble d'enzymes afin de méthyler spécifiquement les cellules protégées de la puromycine (telles que celles de CrisprOff par exemple), et de comparer ces résultats avec les transfusions ARN, au niveau des différences d'expression des gènes cibles. Il serait de plus possible de comparer ces résultats à ceux déjà obtenus concernant l'expression et les niveaux de méthylation de GLUT2; une transfection ADN ayant déjà des effets significatifs sans tri cellulaire (sélection avec antibiotique ou FACS) sur ceux-ci. De plus, l'augmentation des taux de transfection permettrait possiblement d'observer des différences plus significatives entre les conditions, ce qui était peu le cas au cours de nos expériences.

Au niveau de l'expression de nos plasmides après transfection, CrisprOff permet déjà dans certaines conditions de réaliser la méthylation et de réduire l'expression des gènes ciblés par les ARNg; la production de ses ARNm promet donc des applications efficaces.

La transfection d'organoïdes présente des résultats moins marqués que pour les transfections de lignées, et pour cause : leur sensibilité semble bien plus élevée (apoptose si absence de support ou d'autres organoïdes proches, division moins importante et durabilité moindre) mais cela est contrebalancé par la possibilité de reproduire plus fidèlement les différentes populations cellulaires. Parmi les approches que nous avons réalisées, la transfection des organoïdes dissociés en suspension ne semble pas être la meilleure approche, même en adaptant les protocoles de transfection; la culture sur une matrice 2D semble bien plus indiquée selon nos résultats, la survie des organoïdes, les taux de transfection et leur croissances s'en trouvant fortement augmentés. De plus, la remise en dôme après transfection sur matrice 2D semblerait être un bon compromis pour maximiser la survie des organoïdes.

La variation des taux de transfection reste donc assez complexe selon les cellules étudiées, certaines ne réagissant pas de la même manière à un même réactif (par exemple, FuGENE est plus efficace pour les transfections ADN des lignées, là où ICAfectin ADN semble plus indiqué pour la transfection d'organoïdes); il convient donc d'adapter les protocoles aux nombreuses lignées. De notre côté, les résultats prometteurs en transfection ARN et ADN laissent penser qu'il existe encore une marge de progression, que nous espérons franchir une fois les ARNm de nos plasmides obtenus.

Toutefois, nos expériences présentent plusieurs limites : tout d'abord, le manque de reproductibilité entre lignées, même si la comparaison de nos lignées cellulaires par exemple ne montrait pas systématiquement des résultats différents. Une autre limite est le manque de comparaison possible entre les transfectants ADN et ARN, et entre leurs protocoles; dans nos expériences, nous avons donc adopté des quantités compatibles avec les réactifs de transfection, il serait envisageable de comparer les efficacités de transfection selon les concentrations en ADN et ARN, mais celles que nous avons mené laissent penser que des concentrations avec un ratio de 6 : 1 en FuGENE et 1,5 : 1 en ICAfectin ARN semblaient montrer les meilleurs résultats. Toutefois, même pour un même type de matériel, les résultats peuvent varier selon le réactif de transfection. Pour limiter les biais, nous avonsensemencé des quantités de cellules similaires entre nos différentes conditions.

Parmi les pistes d'amélioration, l'utilisation plus systématique de Y27 et de ChIR au cours des transfections et cultures cellulaires reste une option intéressante, ces derniers permettant respectivement aux cellules de ne pas entrer en apoptose ou de se différencier, ce qui pourrait favoriser leur survie, et donc augmenter les taux de transfection. Le tri cellulaire est un autre pilier pour augmenter l'efficacité de transfection : dans notre approche, l'ajout de puromycine permettrait de sélectionner les cellules transfectées des non-transfectées, en leur transfectant un plasmide contenant le gène de résistance à celle-ci, afin d'observer davantage de différence entre les conditions, puisque lors des extractions, les ARN et ADN de toutes les cellules sont obtenus, transfectées ou pas. Cela permettrait d'obtenir des résultats plus significatifs, en particulier pour les gènes peu exprimés de base. Notre plasmide codant la résistance n'a toutefois pas montré d'effet suffisamment important pour permettre de réaliser la sélection de nos IPEC-J2, une mise au point s'avèrera donc nécessaire avant de pouvoir réellement utiliser cette sélection. Afin de

trier nos cellules après transfection, une autre approche serait d'utiliser le FACS, afin de réaliser un tri des cellules transfectées, puisque nos plasmides et ARNm codent une protéine fluorescente, et ce de manière potentiellement plus efficace que la puromycine. D'autres problèmes restent à étudier; il serait intéressant de déterminer le stade de différenciation de nos cellules transfectées, afin de savoir si celui-ci impacte les taux de transfection, et donc le maintien dans le temps de nos cellules transfectées; on peut supposer que les cellules différenciées présentant des récepteurs membranaires différents des cellules davantage souches, leur interaction avec les transfectants pourrait s'en trouver modifiée.

Au niveau de l'observation au microscope, le filtre de fluorescence bleue fait ressortir une forte auto-fluorescence, même dans les conditions non transfectées; l'utilisation de la fluorescence rouge paraît donc davantage indiquée pour marquer les cellules transfectées. De plus, il est possible que les cellules transfectées expriment des quantités faibles de fluorescence; le comptage peut toutefois être facilité par l'utilisation de grossissements plus importants, qui permettent d'augmenter le contraste.

La poursuite des divisions cellulaires reste également un point clé lors de nos transfections, car certaines lignées semblent de manière récurrente cesser de se diviser après transfection, ce qui limite les études de longue durée possibles. La compréhension des mécanismes mis en place permettra entre autres de perfectionner nos approches. Enfin, l'influence de la taille du matériel transfecté (plasmides et ARNm) reste une inconnue au cours de nos expériences, et pourrait également s'avérer cruciale sur la survie et les taux de transfection de nos cellules.

Dans tous les cas, les efficacités mesurées semblent davantage favoriser le développement des transfections d'ARNm *in vivo* en comparaison aux transfections ADN, ce qui sur le long terme représente des applications potentielles très importantes.

Remerciements

Ce projet a reçu un financement du programme de recherche et d'innovation Horizon 2020 de l'Union européenne dans le cadre de la convention de subvention n° 101000236.

Je tiens à remercier Guillaume Devailly et Katia Fève de m'avoir accompagné tout au long de mon stage et d'avoir répondu à mes interrogations; je remercie également les membres de l'équipe qui m'ont accueilli chaleureusement malgré le contexte sanitaire au cours duquel je suis arrivé. Enfin, je remercie tous ceux qui, de loin ou de près, m'ont accompagné au cours de mes expériences et de la vie au laboratoire.

Références bibliographiques

Lunney JK, Van Goor A, Walker KE, Hailstock T, Franklin J & Dai C (2021) Importance of the pig as a human biomedical model. *Sci Transl Med* 13: eabd5758

Kishida K, Pearce SC, Yu S, Gao N & Ferraris RP (2017) Nutrient sensing by absorptive and secretory progenies of small intestinal stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 312: G592–G605 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5495913/> [Accessed May 30, 2022]

- Crawford SE, Ramani S, Blutt SE & Estes MK (2021) Organoids to Dissect Gastrointestinal Virus–Host Interactions: What Have We Learned? *Viruses* 13: 999 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8230193/> [Accessed May 30, 2022]
- Almeqdadi M, Mana MD, Roper J & Yilmaz ÖH (2019) Gut organoids: mini-tissues in culture to study intestinal physiology and disease. *Am J Physiol Cell Physiol* 317: C405–C419 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6766612/> [Accessed May 30, 2022]
- Zhang M-M, Yang K-L, Cui Y-C, Zhou Y-S, Zhang H-R, Wang Q, Ye Y-J, Wang S & Jiang K-W (2021) Current Trends and Research Topics Regarding Intestinal Organoids: An Overview Based on Bibliometrics. *Front Cell Dev Biol* 9: 609452 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8369504/> [Accessed May 30, 2022]
- Smits JPH, Meesters LD, Maste BGW, Zhou H, Zeeuwen PLJM & van den Bogaard EH (2021) CRISPR-Cas9–Based Genomic Engineering in Keratinocytes: From Technology to Application. *JID Innov* 2: 100082 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8819031/> [Accessed May 30, 2022]
- McLenachan S, Sarsero JP & Ioannou PA (2007) Flow-cytometric analysis of mouse embryonic stem cell lipofection using small and large DNA constructs. *Genomics* 89: 708–720 Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S088875430700033X> [Accessed May 30, 2022]
- Gaebler A-M, Hennig A, Buczolic K, Weitz J, Welsch T, Stange DE & Pape K (2020) Universal and Efficient Electroporation Protocol for Genetic Engineering of Gastrointestinal Organoids. *J Vis Exp*
- Strubberg AM, Liu J, Walker NM, Stefanski CD, MacLeod RJ, Magness ST & Clarke LL (2017) Cfr Modulates Wnt/ β -Catenin Signaling and Stem Cell Proliferation in Murine Intestine. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 5: 253–271 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5904038/> [Accessed May 30, 2022]
- Goveas N, Waskow C, Arndt K, Heuberger J, Zhang Q, Alexopoulou D, Dahl A, Birchmeier W, Anastassiadis K, Stewart AF & Kranz A (2021) MLL1 is required for maintenance of intestinal stem cells. *PLoS Genet* 17: e1009250 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8641872/> [Accessed May 30, 2022]
- Li Y, Yang N, Chen J, Huang X, Zhang N, Yang S, Liu G & Liu G (2020) Next-Generation Porcine Intestinal Organoids: an Apical-Out Organoid Model for Swine Enteric Virus

Infection and Immune Response Investigations. *J Virol* **94**: e01006-20 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7565635/> [Accessed May 30, 2022]

Nuñez JK, Chen J, Pommier GC, Cogan JZ, Replogle JM, Adriaens C, Ramadoss GN, Shi Q, Hung KL, Samelson AJ, Pogson AN, Kim JYS, Chung A, Leonetti MD, Chang HY, Kampmann M, Bernstein BE, Hovestadt V, Gilbert LA & Weissman JS (2021) Genome-wide programmable transcriptional memory by CRISPR-based epigenome editing. *Cell* **184**: 2503-2519.e17

Nombre de caractères : 48 242