

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

POTENTIEL CRYOPROTECTEUR DE PROTÉINES DE BLÉ POUR LA SURVIE CELLULAIRE POST-DÉGEL
CHEZ DIFFÉRENTS TYPES CELLULAIRES

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

TOM FRIEDERICH

DÉCEMBRE 2024

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.12-2023). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

À mon directeur de recherche, le Pr. François Ouellet pour sa confiance et son aiguillage qui m'ont permis de conduire ce projet à bon terme.

Au corps professoral et techniciens de l'UQAM pour leur aide et le partage de leur expertise.

Aux membres du jury ayant accepté de juger ce travail.

Aux laboratoires de Corinne Hoesli et Thomas Durcan pour leur collaboration dans l'accomplissement de ce projet.

À Médicament Québec pour le financement d'une partie de ma bourse et activités de recherche.

À Diana Averill et les membres de son laboratoire, Khadija, Georges et Mélanie pour leur aide apportée dans la réalisation de ce travail ainsi que leur camaraderie.

À William pour ses précieux conseils, sa sympathie et son entrain.

À Souleimen pour son aide dans l'acquisition de certaines techniques et sa collégialité.

À mes stagiaires Krishma et Josnel pour leur participation à l'accomplissement de ce projet.

À ma famille et à ma partenaire Hélène pour leur soutien tout au long de ces années.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	viii
RÉSUMÉ.....	ix
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	1
1.1 Introduction	1
1.2 Cryoconservation	1
1.2.1 Histoire	1
1.2.2 Besoins et état actuel.....	2
1.2.3 Problèmes et défis actuels	3
1.3 Cryoconservation des cellules.....	4
1.3.1 Dommages liés au processus de congélation/dégel	4
1.3.2 Méthodes d'évitement des dommages	7
1.3.2.1 Agents de cryoprotection (CPAs).....	7
1.3.2.2 Modulation des propriétés physico-chimiques du milieu de cryoconservation	9
1.3.3 Perspectives d'amélioration des techniques actuelles	10
1.4 Mécanismes de tolérance au gel naturels	12
1.4.1 Tolérance au gel des animaux	13
1.4.2 Tolérance au gel des plantes	13
1.4.3 Protéines de tolérance au gel.....	15
1.4.4 Les protéines de tolérance au gel du blé et leurs applications.....	16
1.5 Différents modèles pour les tests de cryoconservation	17
1.5.1 Modèle procaryote, <i>Escherichia coli</i>	17
1.5.1.1 Généralités.....	17
1.5.1.2 Intérêt comme modèle pour tests de cryoconservation	18
1.5.2 Modèle eucaryote, cellules HeLa	19
1.5.2.1 Généralités.....	19
1.5.2.2 Intérêt comme modèle pour tests de cryoconservation	19
1.5.3 Organoïdes	20
1.5.3.1 Organoïdes cérébraux humains.....	21
1.5.3.2 Organoïdes pancréatiques humains	23
1.6 Étude présente.....	24
1.6.1 Problématique.....	24
1.6.2 Hypothèse et Objectifs.....	25

CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES	26
2.1 Transformation et production des protéines recombinantes	26
2.2 Analyse de séquence et prédictions informatiques.....	27
2.3 Tests avec le modèle <i>E. coli</i>	27
2.3.1 Tests de cryoconservation avec TaENO chez <i>E. coli</i> – Approche par comptage de colonies sur milieu solide	27
2.3.2 Tests de cryoconservation avec TaENO chez <i>E. coli</i> – Approche par cytométrie en flux.....	29
2.4 Tests avec le modèle HeLa– TaENO.....	29
2.5 Tests auprès des organoïdes.....	31
2.5.1 Obtention et entretien des organoïdes.....	31
2.5.2 Fixation des organoïdes.....	32
2.5.3 Clarification des organoïdes	32
2.5.4 Tests de diffusion des protéines d’intérêt marquées avec l’Oregon Green	32
2.5.5 Cryoessais réalisés avec les organoïdes	33
2.5.5.1 Tests de viabilité après cryoconservation.....	33
2.5.5.2 Test CAS-3 clivée	33
CHAPITRE 3 RÉSULTATS.....	36
3.1 Analyses et prédictions effectuées <i>in silico</i>	36
3.2 Validation de l’expression des protéines d’intérêt	39
3.3 Tests de cryoconservation chez <i>E. coli</i> sur milieu solide.....	40
3.4 Tests de cryoconservation chez <i>E. coli</i> par cytométrie en flux	41
3.5 Tests de cryoconservation avec les cellules HeLa.....	43
3.6 Essais auprès des organoïdes.....	46
3.6.1 Tests de diffusion des protéines	47
3.6.1.1 Organoïdes de cerveau	47
3.6.1.2 Organoïdes de pancréas	48
3.6.2 Tests de viabilité.....	50
3.6.2.1 Organoïdes de cerveau	50
3.6.2.2 Organoïdes de pancréas	53
3.6.3 Test CAS-3 clivée	53
CHAPITRE 4 DISCUSSION	57
4.1 Développement de cryoessais avec le modèle procaryote <i>E. coli</i>	57
4.1.1 Viabilité post-dégel déterminée par croissance sur milieu solide	58
4.1.2 Viabilité post-dégel déterminée par cytométrie en flux	59
4.2 Développement de cryoessais avec les cellules HeLa.....	62
4.3 Évaluation de l’effet des protéines de blé cryoactives sur la survie post dégel des organoïdes.....	64
4.3.1 Diffusion des protéines marquées	66
4.3.2 Viabilité des organoïdes cryoconservés en présence des protéines de blé.....	67

CONCLUSION	75
ANNEXE A Carte du vecteur d'expression pTrcHis	78
ANNEXE B Séquence de l'énolase TaENO de blé.....	79
ANNEXE C Amorces utilisées pour la génération des fragments de l'énolase TaENO	81
ANNEXE D Propriétés prédites pour les fragments de l'énolase TaENO	82
ANNEXE E CUBIC <i>Tissus Clearing Protocol</i> – Protocole de transparençation CUBIC.....	83
ANNEXE F 3dGRO <i>Organoid Freeze Medium</i> – Fiche technique	85
ANNEXE G Images supplémentaires d'organoides cérébraux	87
RÉFÉRENCES	88

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Mécanismes potentiels de dommages cellulaires lors de la cryoconservation	5
Figure 1.2 : Dommages induits par les espèces réactives de l'oxygène aux cellules cryoconservées	6
Figure 1.3 : Approches utilisées dans le développement d'organoïdes cérébraux	22
Figure 2.1 : Méthodologie des tests de cryoconservation effectués avec <i>E. coli</i> sur milieu solide	28
Figure 2.2 : Méthodologie des tests de cryoconservation effectués avec <i>E. coli</i> par cytométrie en flux...	30
Figure 2.3 : Méthodologie des tests de cryoconservation réalisés avec les cellules HeLa par cytométrie en flux.....	31
Figure 2.4 : Méthodologie utilisée pour les tests de cryoconservation avec les organoïdes	34
Figure 3.1 : Alignement des séquences de la protéine TaENO-FL avec les séquences des énolasses de blé publiées.....	37
Figure 3.2 : Schématisation et prédiction des structures de TaENO-FL et des fragments générés	38
Figure 3.3 : Validation de l'expression des protéines d'intérêt chez les bactéries transformées	39
Figure 3.4 : Taux de survie des bactéries <i>E. coli</i> après cryoconservation	41
Figure 3.5 : Signal PI des cultures d' <i>E. coli</i> produisant les protéines TaENO dans les cryoessais	42
Figure 3.6 : Signal PI observé chez les cellules HeLa lors des cryoessais avec TaENO.FL.....	44
Figure 3.7 : Signal PI observé chez les cellules HeLa lors des cryoessais avec TaENO.FL et TaENO.C-term.....	45
Figure 3.8 : Taux de mortalité des cellules HeLa obtenus en présence des CPAs testés	46
Figure 3.9 : Diffusion des protéines dans les organoïdes de cerveau	48
Figure 3.10 : Diffusion des protéines dans les organoïdes de pancréas	49
Figure 3.11 : Viabilité d'organoïdes cérébraux après congélation en présence des protéines d'intérêt.....	51
Figure 3.12 : Viabilité d'organoïdes de pancréas après congélation.....	55
Figure 3.13 : Détection de la caspase-3 clivée par immunofluorescence sur coupes histologiques d'organoïdes de cerveau.....	56

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Cryoessais effectués avec organoïdes de cerveau et des organoïdes pancréatiques.....	35
--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

AFPs : *Anti-Freeze Proteins* – protéines antigel

BSA : *Bovine Serum Albumin* - Albumine sérique bovine

Calcéine-AM : Calcéine acétoxy méthylester

CAS-3 : Caspase-3

CPA(s) : *Cryoprotective agents* - Agents cryoprotecteurs

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

hPSCs : *human Pluripotent Stem Cells* – Cellules souches pluripotentes humaines

iPSCs : *induced Pluripotent Stem Cells* – Cellules souches pluripotentes induites

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

IRI : *Ice recrystallisation inhibition* – inhibition de la recristallisation de la glace

LB : *Lysogeny Broth* – Bouillon lysogène

PFA : paraformaldéhyde

PI : *Propidium iodide* – Iodure de propidium

ROCKi : *Rho-associated protein kinase inhibitor* – molécules inhibant l'activité des kinases associées à la protéine Rho

ROS : *Reactive oxygen species* – Espèces réactives de l'oxygène

TaBAS1 : 2-Cys peroxydase du blé

TaENO : Enolase du blé

TaIRI-2 : protéine d'inhibition de la recristallisation de la glace

WCS120 : déhydrine *Wheat Cold-Specific 120* du blé

RÉSUMÉ

La cryoconservation, par sa capacité à ralentir les vitesses de réactions biochimiques, la rend très attractive comme moyen de préserver les matériaux vivants et ainsi permettre leur transport en allongeant le délai permettant leur utilisation. Le processus de cryoconservation doit prendre en compte plusieurs facteurs pour diminuer les dommages entraînés par les processus de gel/dégel (ex : stress oxydatif, apoptose, dommages physiques, ...) et pour ce faire repose sur l'utilisation de composés cryoprotecteurs permettant d'améliorer la survie. La recherche portée sur ces substances est un pivot de la cryoconservation qui vise à dépasser les limites des techniques actuelles reposant sur l'utilisation de composés toxiques. Certains cryoprotecteurs sont issus de mécanismes de résistance au froid chez certains organismes animaux et végétaux. Un exemple est le blé (*Triticum aestivum*), qui tolère le gel grâce à l'expression de plusieurs protéines de tolérance au gel. Parmi celles-ci, l'énolase TaENO ainsi que TaBAS1, WCS120 et TaIRI-2 ont été identifiées dans des études antérieures comme ayant un effet cryoprotecteur sur certaines lignées cellulaires. En utilisant les protéines cryoactives préalablement identifiées dans le blé, nous avons cherché à développer des approches facilement mises en place pour évaluer leur impact sur la survie de divers systèmes vivants lors de leur cryoconservation, notamment *Escherichia coli*, les cellules HeLa, et des organoïdes mésencéphaliques et pancréatiques. Les tests ont montré que TaENO améliore la survie des cellules HeLa lors de la cryoconservation, avec des effets particulièrement marqués pour le fragment C-terminal. Des résultats similaires au contrôle avec la solution 3dGRO ont été observés pour la survie des organoïdes dégelés avec TaENO, TaBAS1, et WCS120, tandis que TaIRI-2 n'a montré aucune activité cryoprotectrice. L'étude met en évidence les effets positifs de ces protéines sur la survie cellulaire en congélation lente, mais la mise en place d'une approche rapide pour évaluer leurs effets cryoprotecteurs et améliorer la cryoconservation des organoïdes nécessitera des études supplémentaires.

Mots clés : Cryoconservation, Survie cellulaire, Protéines, Blé, *Escherichia coli*, Cellules HeLa, Organoïdes

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Introduction

Le gaspillage de matériaux biologiques est une des problématiques les plus importantes de notre société. En recherche et en médecine, les matériaux biologiques regroupent les ressources nécessaires aux diagnostics, traitements ou études, allant des simples cellules isolées aux organes entiers destinés à la transplantation. On retrouve mention de gaspillage dans de nombreux domaines, que ce soit l'alimentaire où près de 40% de l'alimentation mondiale se retrouve jetée ou encore le domaine clinique où près de 2/3 des cœurs de donneurs sont jetés dans le monde alors que la demande de transplantation n'est satisfaite qu'à hauteur de 10% (Organisation mondiale de la Santé, 2020). Une des limites principales à la diminution du gaspillage se trouve dans le temps alloué à l'utilisation des matériaux biologiques, faisant de son augmentation un facteur majeur menant à l'amélioration de la sauvegarde de ces ressources.

La conservation des matériaux biologiques a connu de grands progrès durant les dernières années. Elle consiste le plus souvent à augmenter le temps pendant lequel un matériau désigné va pouvoir conserver ses fonctions, et demeurer utilisable en comparaison à un matériau fraîchement prélevé. Un certain niveau de complexité s'ajoute en fonction du matériau en question et des utilisations qui en découlent. Certains matériaux comme le sang ou certaines structures reproductrices ont déjà vu la durée allouée à leur manipulation, transport et utilisation augmenter grandement au cours des dernières années. Cette augmentation est en grande partie due à l'utilisation de la congélation pour préserver les matériaux, ainsi qu'au ralentissement des processus biologiques qu'elle permet (Chang *et al.*, 2017; Onofre *et al.*, 2016). Malgré les progrès effectués, d'autres structures comme certains organes entiers ou tissus doivent toujours être manipulés dans de brefs délais pour ne pas subir de dommages irréversibles les rendant obsolètes, limitant grandement leur transport et disponibilité.

1.2 Cryoconservation

1.2.1 Histoire

L'utilité de la conservation par l'emploi du froid n'est pas une idée récente comme le démontrent certaines découvertes archéologiques de systèmes de glaciers datant leur apparition environ 2000 ans avant J.C. en Mésopotamie (Bojic *et al.*, 2021) ainsi que des recherches datant du 17^{ème} siècle effectuées par Robert

Boyle sur la résistance au gel/dégel de plusieurs matériaux biologiques et espèces (Boyle et Merret, 1973; Smith, 1970). Actuellement, une distinction est établie entre les effets du froid, observés à des températures inférieures à celles normalement rencontrées par les cellules mammifères (32-37°C) mais supérieures à 0°C, et les effets du gel, qui surviennent sous 0°C. Bien que l'application de ces deux effets dans un but de préservation des matériaux vivants repose sur des procédés similaires, leur mise en œuvre varie. La préservation hypothermique, réalisée à des températures au-dessus de 0 °C, vise à ralentir les processus métaboliques tout en prévision de la formation de glace. En revanche, la préservation par congélation, opérant à des températures en dessous de 0 °C, cherche à contrôler la formation des cristaux de glace pour limiter les dommages structurels et cellulaires associés. La cryoconservation à proprement parler, c'est-à-dire la conservation des matériaux vivants à des températures variant entre -80°C et -196°C, fait son apparition avec la découverte accidentelle des effets cryoprotecteurs du glycérol (CH₂-OH-CHOH-CH₂OH) auprès de spermatozoïdes de volaille (Pegg, 2002; Polge *et al.*, 1949). Le glycérol est un alcool trihydroxyde, pur sous forme de liquide visqueux et transparent, hautement soluble dans l'eau. Grâce à cette solubilité et à sa capacité à pénétrer les cellules, il agit en limitant la formation et la croissance des cristaux de glace lors des processus de congélation et de décongélation. Cette découverte a mis en lumière certains mécanismes de dommages induits par le gel, notamment la formation des cristaux de glace, et a stimulé le développement de nouvelles stratégies pour les atténuer.

1.2.2 Besoins et état actuel

La cryoconservation, en ralentissant les cinétiques des réactions biochimiques, joue un rôle crucial dans de nombreuses applications médicales et scientifiques. Les organes, cellules et tissus biologiques ont une durée de vie limitée lorsqu'ils sont retirés de leur environnement physiologique, en raison de la cessation du métabolisme et des dommages induits par le stress oxydatif. Sans des techniques permettant de stabiliser ces matériaux, leur utilisation devient rapidement impossible, menant à des pertes importantes (Len *et al.*, 2019). En prolongeant leur viabilité, la cryoconservation augmente le temps alloué à leur manipulation et leur usage, évitant ainsi le gaspillage et augmentant leur disponibilité. Dans le domaine de la transplantation, elle permet de respecter les délais critiques entre prélèvement et greffe, augmentant considérablement les chances de succès des interventions. Ce principe repose sur la privation de l'énergie thermique nécessaire pour les réactions métaboliques (Bojic *et al.*, 2021). Aujourd'hui, ses applications couvrent des secteurs variés, notamment la médecine, où elle facilite le stockage et le transport des matériaux biologiques. Il serait impossible d'atteindre l'efficacité actuelle de certains

domaines médicaux tels que la reproduction assistée, la transplantation ou la thérapie cellulaire sans l'appui des méthodes de cryoconservation (Bojic *et al.*, 2021).

Les besoins contemporains demeurent plus grands que la disponibilité de matériaux vivants prêts à l'utilisation et encouragent la recherche en cryoconservation à trouver de nouvelles alternatives pour prolonger le temps de conservation des tissus et organes. Cette prolongation pourrait permettre le transport d'organes ou de tissus vers des zones géographiques plus étendues et aussi permettre d'en faire de meilleures évaluations et caractérisations avant leur utilisation.

L'établissement de banques biologiques est aussi devenu une partie essentielle de plusieurs programmes de recherche scientifique et clinique. Ces structures permettent une disponibilité de matériaux biologiques pour l'analyse, le traitement et l'expérimentation mais aussi d'établir des répertoires de ressources génétiques sur le long terme la plupart du temps par appui sur les techniques de cryoconservation (De Paoli, 2005). Si certaines banques biologiques sont déjà mises en place, il reste encore plusieurs types de matériaux qui ne peuvent être adéquatement conservés pendant de longues périodes, comme le cœur humain (Khaydukova *et al.*, 2024) et d'autres dont le coût logistique associé est encore trop grand pour en justifier la mise en place.

1.2.3 Problèmes et défis actuels

Au-delà du progrès nécessaire dans certaines techniques, le domaine de la cryoconservation se confronte à plusieurs problèmes au niveau de son application. En effet ce domaine implique des coûts importants liés aux équipements spécialisés, aux consommables et à la maintenance des échantillons à de très basses températures pendant de longues périodes (Pegg, 2015).

Les protocoles de cryoconservation doivent être adaptés à l'échantillon en prenant en compte le ou les types cellulaires concernés ainsi que les interactions y prenant part comme dans l'exemple d'un tissu. Cette spécificité complique la généralisation des protocoles de cryoconservation et oblige une connaissance précise des paramètres physico-chimiques rencontrés par les cellules lors de leur cryoconservation. La recherche nécessaire et les coûts associés sont d'autant plus importants dans le cadre de la cryoconservation à grande échelle où de grands nombres et/ou volumes d'échantillons sont à préserver dans des conditions contrôlées. L'augmentation du volume, du nombre et de la diversité des matériaux préservables est un pivot dans l'établissement de bio-banques car souvent limitante d'un point

de vue logistique et technique. L'augmentation du volume des échantillons cryoconservés est limitée notamment par la formation de gradients de températures plus importants en fonction du volume concerné. Les variations de températures provoquent des effets néfastes sur la survie cellulaire lors de la cryoconservation d'un organisme car elles encouragent la formation de cristaux de glace internes. Les coûts associés à la cryoconservation sont aussi à prendre en compte dans les défis rencontrés par le domaine, la cryoconservation reposant souvent sur l'usage de grands volumes d'azote liquide ou d'autres consommables ainsi que d'infrastructures spécialisées, sa mise en place peut être coûteuse. Certaines études discutent le rapport entre les coûts associés à la cryoconservation et ses avantages et la présente comme un moyen efficace d'économiser des coûts logistiques notamment au niveau du maintien en cultures de certains types de matériaux sur de longues durées (Benelli, 2021; Fuchs Weizman *et al.*, 2021). Enfin, malgré les progrès effectués dans la disponibilité de modèles fidèles au cours de ces dernières années, le problème de la translation des techniques de cryoconservation développées au domaine clinique se pose toujours et nécessite une validation réglementaire et efficace auprès des échantillons humains notamment.

1.3 Cryoconservation des cellules

1.3.1 Dommages liés au processus de congélation/dégel

La plupart des cellules ont évolué de sorte à pouvoir fonctionner dans des intervalles de températures précis permettant ainsi d'assurer leur homéostasie et de remplir leurs fonctions normales. Bien que les températures négatives ne soient pas intrinsèquement pathologiques elles s'accompagnent en général de dommages lorsqu'imposées directement aux cellules (ex : engelures, perte de fonction par hypothermie). Ces dommages, bien qu'associés au froid, seraient plutôt liés aux transitions entre les températures tolérées par la cellule vers les températures négatives et les événements physico-chimiques qui en découlent (Bojic *et al.*, 2021).

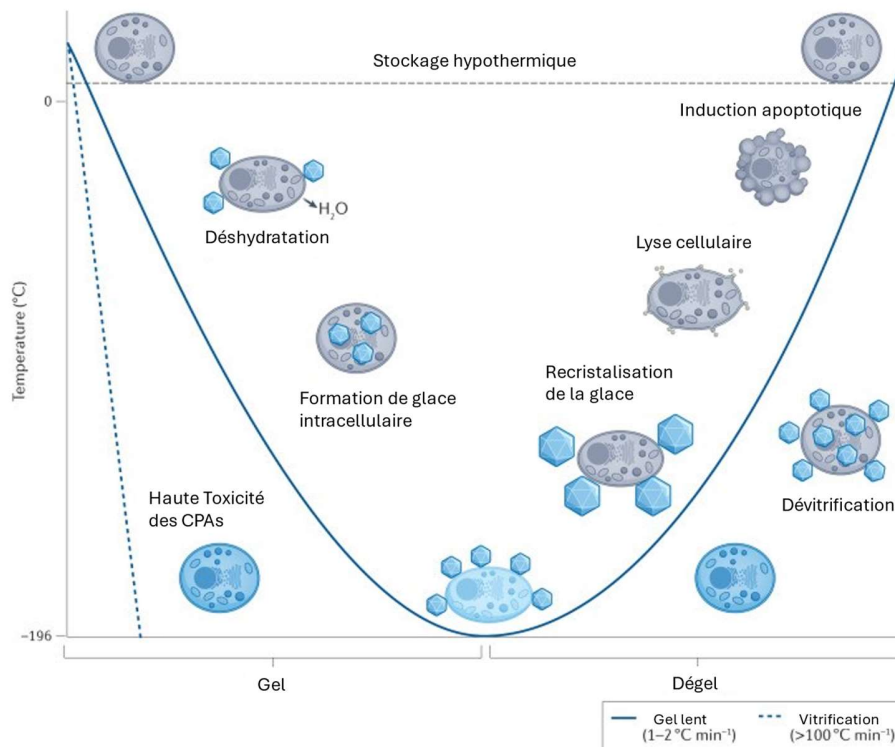


Figure 1.1 Mécanismes potentiels de dommages cellulaires lors de la cryoconservation (Traduit de Murray et Gibson, 2022)

Comme indiqué sur la figure 1.1, une des principales sources de dommages rencontrés lors de cette transition est la formation des cristaux de glace, aussi appelée nucléation des cristaux de glace (représenté par les hexagones bleus sur la figure). C'est un processus lors duquel le refroidissement de l'eau en dessous de son point de congélation mène à la formation de noyaux auxquels les molécules d'eau vont se fixer menant ainsi à la formation des cristaux solides. Lors de la nucléation des cristaux de glace qui débute normalement dans l'espace extracellulaire car moins concentré en solutés, ces derniers sont exclus des cristaux de glace et voient donc leur concentration dans le milieu extérieur à la cellule augmenter. L'équilibre osmotique de la cellule est ainsi perturbé par la transition vers des températures négatives et l'augmentation de la concentration en solutés à l'extérieur qui va pousser l'eau à sortir de la cellule pour rétablir l'équilibre perdu, entraînant ainsi une déshydratation de la cellule.

L'exclusion de l'eau et l'augmentation de la concentration en solutés dans le milieu intracellulaire rend la nucléation de cristaux de glace plus rare mais déshydrate la cellule tout en augmentant la probabilité de formation des cristaux dans le milieu extracellulaire. Cette formation de glace peut causer des dommages

à la cellule en dérangeant directement la structure des membranes cellulaires ou des structures extramembranaires. L'augmentation de la concentration des solutés dans le milieu intracellulaire lors des processus de gel/dégel peut entraîner un stress osmotique considérable.

La vitesse de gel et de dégel est aussi à prendre en compte lors de la cryoconservation des cellules puisqu'une diminution trop rapide des températures diminue la sortie de l'eau de la cellule et peut ainsi mener à la formation de cristaux de glace intracellulaires, encore plus dommageables pour la cellule car pouvant mener à la destruction de certaines structures. Une augmentation de la température trop rapide lors du dégel pourrait quant à elle provoquer une réhydratation de la cellule trop brusque pouvant mener à sa lyse comme décrit dans la figure 1.1. Ce phénomène est accentué par la fragilisation des membranes cellulaires soumises au gel et au dégel.

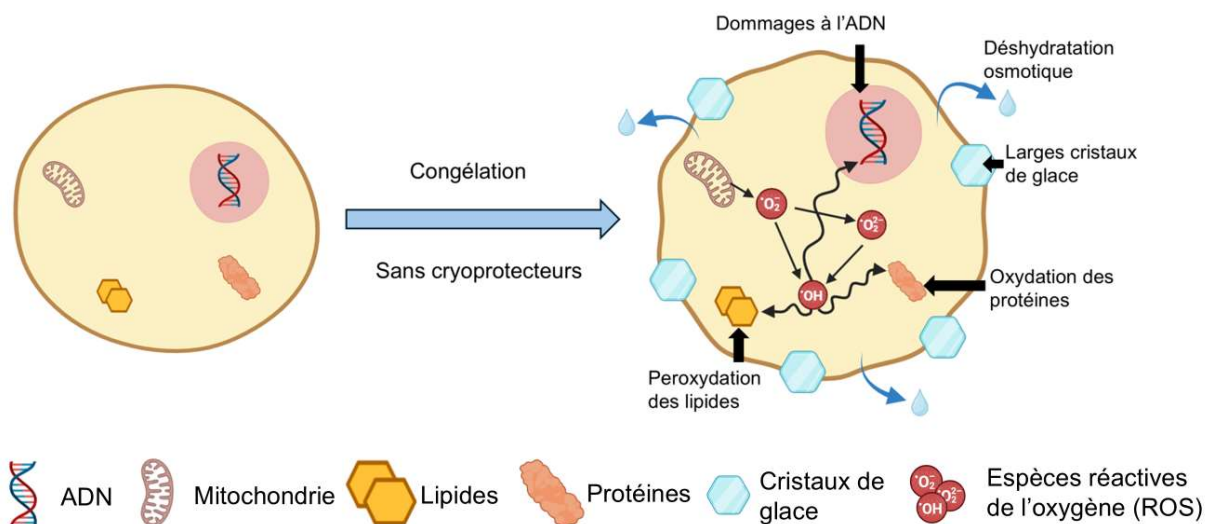


Figure 1.2 : Dommages induits par les espèces réactives de l'oxygène aux cellules cryoconservées (Adaptée de Liu *et al.*, 2021)

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) jouent un rôle central dans les dommages subis par les cellules lors des processus de gel et de dégel, comme schématisé dans la figure 1.2. Ces molécules, produites naturellement dans les cellules via la chaîne de transport des électrons mitochondriale, voient leur concentration augmenter de manière significative sous l'effet du stress induit par les variations de température. Lors du gel, une diminution de l'activité enzymatique, notamment des systèmes antioxydants tels que la superoxyde dismutase ou la catalase, limite la capacité des cellules à neutraliser les ROS (Aliakbari *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2021). De plus, les fluctuations de température peuvent altérer

les membranes mitochondriales, augmentant la fuite d'électrons et exacerbant la production de ROS. Ce stress oxydatif entraîne une peroxydation des lipides, compromettant l'intégrité des membranes cellulaires, une oxydation des protéines, perturbant leur structure et fonction, ainsi qu'une fragmentation de l'ADN, qui affecte directement la survie cellulaire. L'ensemble de ces dommages contribue à fragiliser les cellules et peut précipiter l'activation des mécanismes de mort cellulaire (Len *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2021).

Les dommages pouvant subvenir auprès des cellules lors des processus de cryoconservation peuvent en effet mener à l'activation de voies menant à la mort cellulaire, dites « voies apoptotiques ». Il existe plusieurs voies d'activation de l'apoptose et ces mécanismes sont essentiels pour l'équilibre des systèmes cellulaires. Lors des transitions de température imposées aux cellules par les protocoles de cryoconservation, les dommages provoqués à certaines structures peuvent être suffisants pour que la cellule estime ces derniers irréparables et enclenche une voie menant à sa mort. Trois voies métaboliques majeures mènent à l'apoptose des cellules, elles reposent en général sur une cascade d'activation de cystéines protéases qui ont la capacité de cliver un grand nombre de substrats protéiques (autres caspases, protéines de structure, enzymes nucléiques, ...).

1.3.2 Méthodes d'évitement des dommages

1.3.2.1 Agents de cryoprotection (CPAs)

Pour réduire les atteintes des transitions de températures lors des protocoles de cryoconservation, des substances qualifiées de cryoprotecteurs (CPAs – *Cryoprotective agents*) sont utilisées. Ces substances ont divers mécanismes d'action permettant d'améliorer la survie des échantillons en diminuant les atteintes des sources de dommages énoncées précédemment.

Une des applications principales des cryoprotecteurs se trouve dans la diminution de la formation de cristaux de glace lors des transitions de températures imposés aux cellules. Certains cryoprotecteurs permettent d'empêcher entièrement la formation de cristaux de glace donnant lieu à la vitrification de l'échantillon. La vitrification est un processus par lequel un liquide se solidifie sans formation de cristaux, grâce à un refroidissement rapide qui permet d'atteindre une température spécifique, appelée température de transition vitreuse (Taylor *et al.*, 2019). Ce phénomène s'observe néanmoins à de hautes concentrations de cryoprotecteurs, souvent toxiques pour la cellule et pouvant diminuer sa survie post-dégel en cas de contact prolongé (Rogulska *et al.*, 2023). La toxicité des substances cryoprotectrices peut

être observée auprès de types cellulaires spécifiques dans certains cas mais prend place plus généralement de manière non-spécifique par la capacité des CPAs à perturber les liens hydrogènes effectués par les molécules d'eau (empêchant ainsi la formation de cristaux de glace) causant une toxicité non-spécifique (Best, 2015). La toxicité est un problème majeur de l'utilisation des cryoprotecteurs en cryoconservation et encourage la recherche de moyens de diminuer les concentrations nécessaires ou trouver des alternatives comme des cryoprotecteurs d'origine naturelle souvent moins dommageables.

Parmi les cryoprotecteurs les plus communément utilisés se trouvent le diméthyl-sulfoxyde (DMSO; $\text{CH}_3\text{-SO-CH}_3$) ou le glycérol. Ces composés sont couramment utilisés dans les protocoles de cryoconservation de cellules et de certains tissus en laboratoire (Santos *et al.*, 2003) et permettent d'en améliorer la survie après dégel. Il s'agit de cryoprotecteurs pénétrants, qui vont entrer dans la cellule avec plus ou moins de facilité et perturber la nucléation des cristaux de glace en formant des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau intracellulaires prévenant ainsi la déshydratation en réduisant la quantité d'eau absorbée par les cristaux de glace (Erol *et al.*, 2021).

D'autres cryoprotecteurs n'entrent pas dans le milieu intracellulaire mais offrent une amélioration de la survie de l'échantillon en modifiant certaines propriétés du milieu extracellulaire, il s'agit des cryoprotecteurs non pénétrants. Plusieurs exemples de ce type de cryoprotecteurs sont connus et explorés dans la littérature, ils présentent souvent une toxicité diminuée par rapport à leurs équivalents pénétrants et sont plus simples à éliminer en vue de manipulations (ex : transplantation).

La combinaison de différents cryoprotecteurs est souvent préférable afin de réduire la toxicité spécifique des substances utilisées, certains protocoles combinent les effets de cryoprotecteurs pénétrants et non-pénétrants pour réduire les quantités nécessaires de cryoprotecteurs pénétrants et réduire le nombre et la taille des cristaux de glace permettant d'atteindre un état proche de la vitrification du milieu. Certaines solutions commercialisées pour des usages de cryoconservation reposent aussi sur différentes combinaisons de cryoprotecteurs permettant l'amélioration de la survie après dégel de types ou systèmes cellulaires spécifiques (ex : CryoStor® (BioLife Solutions), Synth-a-Freeze™ (Thermo Fisher Scientific), Cryo-Gold™ (Abcam), ...). La composition exacte de ces solutions commerciales est souvent protégée par des formulations propriétaires, ce qui rend difficile l'obtention de détails précis sur leurs ingrédients. Ces solutions reposent le plus souvent sur l'utilisation du DMSO comme ingrédient actif à un pourcentage variable, associé à d'autres cryoprotecteurs tels que le glycérol ou des sucres (comme le tréhalose), ainsi

qu'à des molécules stabilisatrices ou osmoprotectrices. Leur composition est généralement optimisée pour répondre aux besoins spécifiques de certains types de cellules ou de tissus.

En plus de l'atténuation des dommages directement causés par les changements de températures subis lors des protocoles de cryoconservation, certains CPAs sont employés pour leur capacité à inhiber des processus métaboliques susceptibles de réduire la survie des échantillons, en limitant les voies conduisant à des dommages irréversibles ou à la mort cellulaire. Un exemple de ce genre de composés sont les inhibiteurs apoptotiques utilisés pour réduire l'activation des caspases effectrices de l'apoptose (ex : inhibiteurs des ROCK) ou encore les substances capables de réguler les stress consécutifs au dégel (antioxydants, ...) (Bissoyi *et al.*, 2014).

1.3.2.2 Modulation des propriétés physico-chimiques du milieu de cryoconservation

Les vitesses de gel et de dégel peuvent grandement influencer sur la sortie de l'eau des cellules, en faisant un paramètre à prendre en compte lors de l'établissement d'un protocole de cryoconservation adapté. Pour diminuer les dommages liés à la formation de cristaux de glace intracellulaires, il est nécessaire que l'eau puisse quitter la cellule pendant la diminution de la température du milieu tout en considérant le mouvement de l'eau au travers des membranes pendant ce processus (Whaley *et al.*, 2021). Puisque la sortie de l'eau de la cellule dépend aussi de la surface disponible dédiée, la taille des cellules est souvent à considérer pour l'optimisation des vitesses de gel et de dégel. Il est généralement accepté qu'une diminution de la température rapide ne permet pas la sortie suffisante de l'eau depuis le milieu intracellulaire augmentant les chances de nucléation de cristaux de glace. Les protocoles de cryoconservation communs optent donc pour une vitesse de congélation d'environ 1°C/min qui convient à la majeure partie des cellules (Erol *et al.*, 2021). Le rythme de diminution des températures de l'échantillon peut être achevé par l'utilisation de congélateurs programmables ou de récipients de congélation avec bac d'alcool type MrFrosty (ThermoFisher Scientific) permettent de refroidir les échantillons à une vitesse proche de -1°C par minute.

La détermination de la vitesse de variation de la température lors du dégel est souvent considérée comme une étape moins cruciale du développement d'une méthode de cryoconservation et il est commun de faire transiter les échantillons directement de l'azote liquide (-196°C phase liquide, -140°C phase gazeuse) vers un bain thermostaté à 37°C résultant en une hausse de température rapide (45–70°C/min) (Whaley *et al.*, 2021). Peu d'études sont disponibles sur l'effet de la modification de la vitesse de dégel, mais certaines

corrèlent une augmentation des effets toxiques de certains cryoprotecteurs comme le DMSO avec une augmentation plus lente de la température de l'échantillon (Baboo *et al.*, 2019). La vitesse de réchauffement d'un échantillon est néanmoins liée à des événements physico-chimiques importants comme l'entrée/sortie de l'eau et des CPAs, en faisant un paramètre important à considérer. Une avenue de recherche dont l'exploration a débuté plutôt récemment est l'homogénéité du réchauffement d'un échantillon. Dans la plupart des protocoles de cryoconservation, les échantillons sont réchauffés rapidement à l'aide d'un bain thermostaté, une méthode qui soulève des enjeux de stérilité et entraîne un réchauffement non uniforme, en agissant principalement par l'extérieur de l'échantillon (Chiu-Lam *et al.*, 2021). Le réchauffement de l'échantillon par conduction au travers du milieu résulte en la formation de gradients de température dont le point le plus froid demeure situé au centre du volume à réchauffer pendant une majeure partie de l'étape du dégel. Les gradients de température formés sont propices à la formation de cristaux de glace lors du dégel par recristallisation à cause des différentes températures auxquels le milieu sera soumis (Wang *et al.*, 2019). Le réchauffement des échantillons et les dommages entraînés par des gradients de températures non-homogènes lors de ce dernier constituent une des limites principales à la cryoconservation efficace d'échantillons volumineux comme des organes. Une des solutions proposées au réchauffement homogène des échantillons pour leur dégel est l'utilisation de nano-particules magnétiques (décrit plus bas) permettant d'augmenter la température de l'échantillon directement depuis l'intérieur en comparaison à un bain thermostaté qui réchauffe l'échantillon par le biais de son contenant.

Parmi les autres paramètres qu'il est nécessaire de monitorer lors de protocoles de cryoconservation se trouve le pH. Lors de la cryoconservation, le pH des solutions a tendance à baisser à mesure que la température diminue. Cette acidification résulte principalement de l'exclusion de solutés par la glace en formation, ce qui augmente localement la concentration d'ions libérés par le tampon. Les tampons contenant des composants sensibles aux variations de température, comme les phosphates, peuvent exacerber ces changements en raison de la cristallisation eutectique et des variations de solubilité. Cette baisse du pH peut nuire à la stabilité des biomolécules ou des cellules conservées (Kolhe *et al.*, 2010).

1.3.3 Perspectives d'amélioration des techniques actuelles

Si l'émergence de nouveaux agents de cryoprotection et de nouvelles techniques permet de mieux atténuer les dommages induits par les processus de gel et de dégel, certains facteurs demeurent à optimiser au sein des protocoles de cryoconservation. Parmi eux se trouve la question de l'utilisation du

DMSO ou d'autres CPAs aux effets toxiques spécifiques dont la réduction de la concentration utilisée ne résulte pas en l'absence de potentiels effets secondaires indésirables (Bojic *et al.*, 2021; Lewis *et al.*, 2016). Cette question a poussé la recherche de moyens de contournement de l'utilisation de ces composés comme l'utilisation de composés naturels avec un potentiel pour remplacer ou substituer partiellement leur utilisation. Des composés améliorant la résistance au froid chez l'animal et le végétal et certains sont déjà le sujet d'études en cryoconservation visant à la caractérisation de leurs effets et de leurs potentielles applications à d'autres systèmes (Marcantonini *et al.*, 2022). En effet, la possibilité d'utiliser des composés naturels pour contourner les limitations imposées par les cryoprotecteurs communément utilisés est un pilier de la recherche actuelle en cryoconservation. Plusieurs substances cytoprotectrices ont déjà été mises de l'avant pour leur capacité à diminuer l'atteinte produite par les protocoles de cryoconservation ou directement par les cryoprotecteurs utilisés, comme les antioxydants ou des agents de réduction du stress cellulaire. D'autres composés, comme les protéines antigel (AFPs), qui appartiennent à la famille des protéines de liaison à la glace (*ice-binding proteins*, IBPs), permettent le remplacement voire la substitution complète des CPAs couramment utilisés.

Une autre solution se trouve dans l'utilisation de techniques permettant l'allègement de la charge en cryoprotecteurs tout en assurant une meilleure viabilité post-dégel. Ces techniques influent sur des paramètres externes à la composition du milieu en modulant notamment les rythmes de gel/dégel et la pression appliquée aux milieux de congélation. Ces techniques permettent une modification des propriétés du milieu en diminuant la probabilité de formation de cristaux de glace notamment sans nécessiter l'usage de substances chimiques. La congélation isochorique se base sur l'évitement des modifications de volume de l'échantillon lors du gel de ce dernier, résultant en une diminution de la probabilité de nucléation de cristaux de glace par congélation sous pression constante régulée (Rubinsky *et al.*, 2005). La diminution de la glace formée se fait en tirant parti de la thermodynamique des gradients de phase pression-température de l'eau et d'autres solutés pour éviter la formation de glace (Taylor *et al.*, 2019).

Un autre exemple de ce genre de techniques se trouve dans l'utilisation de nano-particules magnétiques permettant d'augmenter la température de l'échantillon de manière homogène. Cette technique nommée *nano-warming* fait l'objet de recherches sur sa capacité à pouvoir potentiellement dégeler des structures plus volumineuses (ex : organes, tissus, organoïdes, etc ...) et d'éviter la formation de gradients de températures favorisant la formation de cristaux de glace dans le milieu (Ito *et al.*, 2020). L'excitation des

nano-particules intégrées à l'échantillon et/ou le milieu de congélation amène à une augmentation de la température par dégagement de l'énergie emmagasinée sous forme de chaleur, résultant en un dégel homogène de l'échantillon. Cependant, l'implantation de cette méthode nécessite que les nanoparticules soient non seulement internalisées efficacement dans les structures biologiques sans leur causer de dommages, mais également éliminées facilement après le dégel, sans compromettre l'intégrité des échantillons.

1.4 Mécanismes de tolérance au gel naturels

Dans la nature, de nombreux organismes doivent faire face à des températures en dessous des seuils considérés normothermiques. La réponse des organismes au froid varie dans la nature et certains ont développé des mécanismes permettant une acclimatation au froid voire au gel, leur permettant d'améliorer leur survie dans des conditions extrêmes peu favorables à d'autres organismes moins adaptés. Ces réponses d'acclimatation consistent la plupart du temps en modifications morphologiques, physiologiques, moléculaires et biochimiques chez l'organisme lui offrant une meilleure endurance face aux stress engendrés par les températures basses. Ces modifications sont d'un intérêt dans les études de cryoconservation à la recherche d'alternatives aux CPAs synthétiques qui présentent des limites en termes de toxicité et d'efficacité cryoprotectrice (Marcantonini *et al.*, 2022). Elles mènent à l'accumulation d'agents naturels avec des fonctions de cytoprotection, comme les antioxydants et les agents de préservation du stress cellulaire (par exemple, l'acide ascorbique, la vitamine E, le glutathion, et des substances phénoliques telles que la mélatonine et la quercétine) qui peuvent aussi être utilisés pour mitiger les effets oxydants et cytotoxiques provoqués par les protocoles de cryoconservation (Marcantonini *et al.*, 2022). Les types de composés les plus pertinents pour des applications de cryoconservation mis de l'avant par ces études sont les protéines antigel (*Anti-Freeze Proteins - AFPs*), les sucres et les solvants eutectiques naturels (*Natural Deep Eutectic Systems – NADES*) qui sont des mélanges homogènes de deux ou plusieurs composés formant une phase liquide stable à basse température, souvent grâce à des interactions hydrogène. Ces composés présentent un intérêt particulier par le fait que certains possèdent des activités d'hystérésis thermique (*Thermal hysteresis – TH*) et/ou d'inhibition de la recristallisation de la glace (*Ice recrystallisation inhibition – IRI*). Ces activités, permettant respectivement de diminuer le point de gel des solutions et la taille des cristaux de glace formés, sont bénéfiques dans la protection des cellules face au gel et présentent de potentielles application auprès d'autres organismes en tant que substances cryoprotectrices (Taylor *et al.*, 2019).

1.4.1 Tolérance au gel des animaux

Les températures négatives peuvent entraîner des comportements d'évitement tels la migration saisonnière observée chez certains oiseaux qui parcourent des milliers de kilomètres pour atteindre des zones plus chaudes (Berthold et Helbig, 1992), ou encore l'hibernation chez des mammifères comme les chauves-souris et les ours, qui entrent dans un état de dormance prolongée pour économiser l'énergie durant les périodes froides (Carey *et al.*, 2003). Cependant, certains animaux ne peuvent éviter ces conditions rigoureuses et doivent développer des mécanismes physiologiques et moléculaires spécifiques leur permettant de tolérer le gel. Ces mécanismes incluent, chez plusieurs espèces, la synthèse de composés spécifiques tels que des protéines antigel ou d'autres molécules cryoprotectrices, qui jouent un rôle clé dans leur survie face aux températures extrêmes. Les AFPs présentes chez certains poissons antarctiques, insectes, batraciens, et plantes tolérantes au gel, protègent ces organismes du gel à des températures en dessous de $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ et certaines sont déjà étudiées pour leur applications potentielles auprès de différents systèmes (Gilfanova *et al.*, 2021; Marcantonini *et al.*, 2022). Chez les poissons antarctiques, les AFPs stabilisent les fluides corporels à $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ en empêchant la croissance des cristaux de glace et permettant aux poissons de survivre à des températures négatives (Rubinsky *et al.*, 1992). Chez les batraciens tels que *Rana sylvatica* (la grenouille des bois), ces protéines permettent la tolérance au gel par la stabilisation des membranes cellulaires et la réduction des dommages induits par la congélation des fluides extracellulaires. Ce mécanisme unique leur permet de survivre en état gelé pendant plusieurs semaines sans compromettre leur viabilité (Costanzo et Jr, 2011). Ainsi, certains de ces cryoprotecteurs, comme le jaune d'œuf, riche en lipoprotéines et phospholipides, sont aujourd'hui utilisés en cryopréservation pour protéger les membranes cellulaires contre les dommages induits par la congélation. Découverts à l'origine dans la nature, ces composés démontrent des applications prometteuses en biotechnologie et médecine, notamment dans la conservation des cellules, des tissus et des gamètes, où leur capacité à réduire les dommages structurels et oxydatifs est cruciale (Hernández-Avilés *et al.*, 2023; Kim *et al.*, 2017).

1.4.2 Tolérance au gel des plantes

Les plantes sont des organismes sessiles qui doivent constamment faire face à des stress environnementaux tels que les températures extrêmes, les radiations UV, la sécheresse, la surhydratation, la toxicité des minéraux et les attaques de pathogènes (Satyakam *et al.*, 2022). Contrairement à des organismes mobiles capables d'évader certains stress en changeant de localisation, les plantes subissent directement leurs atteintes et doivent donc assurer leur survie en adoptant des réponses d'acclimatation.

Parmi les stress rencontrés par les plantes, le froid et le gel diminuent considérablement la distribution, la croissance et la survie des plantes en impactant notamment la fluidité des membranes, la balance ionique et hydrique ainsi qu'en générant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui vont à leur tour endommager l'ADN/ARN, menacer la stabilité des protéines et diminuer l'efficacité de la photosynthèse ou d'autres réactions biochimiques (Furtauer *et al.*, 2019; Satyakam *et al.*, 2022). Chez certaines plantes, une exposition à des températures basses (supérieures au point de gel de l'eau) engendre une survie supérieure lors de leur exposition à des températures négatives, mettant de l'avant une réponse d'acclimatation que l'on retrouve à l'état naturel avec les rythmes saisonniers et les variations de températures associées. Les plantes exposées à des températures non-léthales vont donc mieux résister aux stress induits par le froid et ainsi pouvoir assurer un meilleur rendement grâce à la mise en place d'une réponse d'acclimatation (Ding *et al.*, 2019). La réponse d'acclimatation au froid est constituée d'une série d'évènements physicochimiques menant à la synthèse de composés impliqués dans la régulation osmotique, le contrôle de la formation des cristaux de glace, la stabilité des membranes cellulaires et la diminution des effets néfastes des ROS produits chez les plantes soumises au stress de basses températures (Ding *et al.*, 2019; Furtauer *et al.*, 2019). La perception de la diminution des températures chez les plantes est associée à des changements dans la fluidité des membranes, ce qui déclenche l'activation de voies signalétiques régulant l'expression des gènes en réponse au froid (Furtauer *et al.*, 2019; Ouellet et Charron, 2001). Ces gènes sont regroupés dans une catégorie appelée *Cold regulated* (COR) comprenant ceux qui se retrouvent induits et/ou régulés des suites d'une exposition au froid. Les COR incluent non seulement des gènes codant pour des protéines protectrices comme les déhydrines, mais aussi des gènes régulant la transcription et la signalisation, comme ceux codant pour des facteurs de transcription (ex. : CBF/DREB1) qui activent les réseaux de réponse au froid, et des kinases impliquées dans la transduction du signal (Hwarari *et al.*, 2022). Leur activation mène à la synthèse d'osmolytes et de protéines cryoprotectrices afin de protéger les plantes des atteintes causées par le gel. Parmi les protéines synthétisées, certaines peuvent aussi se lier directement aux promoteurs des COR et induire leur expression (Ding *et al.*, 2019), renforçant ainsi la tolérance au gel. Parmi les effecteurs accumulés en aval de cette voie se trouvent plusieurs autres types de composés comme des sucres métaboliquement actifs ou servant de substrats à la synthèse de métabolites secondaires, certains acides aminés spécifiques (proline, glycine, alanine et sérine), des polyamines, des bêtaïnes et des métabolites secondaires (Furtauer *et al.*, 2019; Satyakam *et al.*, 2022).

1.4.3 Protéines de tolérance au gel

Parmi les composés dont la synthèse est induite lors de la réponse des plantes au gel, les protéines sont une catégorie très étudiée en partie à cause de la multiplicité des fonctions leur étant associées au cours des dernières années. Les protéines concernées sont majoritairement des protéines de réponses au stress et appartiennent à plusieurs catégories dont : les AFPs (*Anti Freezing Proteins*), les CSPs (*Cold Shock Proteins*), les HSPs (*Heat Shock Proteins*) et les LEAs (*Late Embryogenic Abundant proteins*) (Ding *et al.*, 2019; Satyakam *et al.*, 2022). Les LEAs sont des protéines qui ont en commun de posséder un ou plusieurs domaines hydrophiles et sont capables, comme la protéine produite par *Arabidopsis thaliana Cold-Regulated 15A* (COR15A), de stabiliser les membranes cellulaires, diminuant la déshydratation et améliorant la résistance au gel (Ding *et al.*, 2019). Les CSPs sont des protéines porteuses d'un domaine qualifié de « *Cold Shock Domain* » qui est aussi retrouvé chez l'animal et certaines bactéries. Leur principale fonction est celle de chaperonne pour l'ARN évitant la perte de structures secondaires souvent subie par l'ARN mal replié à de basses températures. Les HSPs sont aussi une famille de protéines avec des fonctions de chaperonnes capables d'empêcher le mauvais repliement ou la dégradation de certaines protéines. Bien que cette catégorie de protéines soit liée à des réponses de thermotolérance, son effet protecteur auprès d'enzymes antioxydantes comme la SOD (superoxyde dismutase) ou la catalase (Ul Haq *et al.*, 2019) en font un allié important dans la tolérance au gel chez les plantes. Les AFPs (*Anti-Freeze Proteins*) constituent une classe largement étudiée de protéines de résistance au gel. Bien que des AFPs soient présentes dans divers organismes, notamment des poissons et des insectes, les plantes possèdent des variantes spécifiques qui suscitent un intérêt particulier (Wisniewski *et al.*, 2020). Leur fonction principale est d'interagir avec les molécules d'eau et de causer une diminution de sa température de cristallisation appelée aussi activité IRI (*Ice Recrystallisation Inhibition*). La liaison des AFPs aux cristaux de glace se fait par l'intermédiaire d'un domaine de liaison à la glace plutôt bien conservé entre les espèces (Jia et Davies, 2002). Il existe néanmoins de grandes différences dans le reste de la séquence des protéines les arborant. Plusieurs AFPs retrouvées chez les animaux démontrent des capacités de cryoprotecteur en se liant aux membranes et protéines pour réduire l'atteinte par le gel, phénomène qui demeure encore à être observé pour les AFPs des plantes. Les AFPs naturellement synthétisées par les plantes présentent une grande opportunité de recherche par leur diversité encore peu explorée, offrant un potentiel élevé pour découvrir des variantes plus efficaces ou présentant des fonctions complémentaires, comme une meilleure activité IRI ou une toxicité réduite. De plus, certaines AFPs végétales possèdent des structures particulièrement adaptées aux environnements extracellulaires ou à différentes conditions de

cryoconservation, renforçant leur pertinence pour des applications biotechnologiques (Bredow et Walker, 2017; Ekpo *et al.*, 2022).

1.4.4 Les protéines de tolérance au gel du blé et leurs applications

Plusieurs gènes du blé sont surexprimés lors de la réponse d'acclimatation au froid, généralement induite par des températures inférieures à 10 °C, souvent après 2 à 4 jours d'exposition (Fowler, 2008). Ces gènes mènent à la synthèse de protéines protégeant les cellules de la déshydratation, des atteintes des ROS (osmoprotecteurs et antioxydants), de LEA, d'AFPs, de chaperonnes et d'enzymes de détoxification (Fowler, 2008; Hassan *et al.*, 2021). Ces protéines ont été étudiées dans des buts d'applications à d'autres cultivars par transgénèse ou hybridation pour amélioration des rendements, elles trouvent aussi des applications dans d'autres domaines grâce à leurs fonctions diverses et leur toxicité souvent limitée (Dang et Van Damme, 2015). Parmi ces protéines, 4 ont été mises en lien avec des améliorations de la survie d'hépatocytes de rat en comparaison à l'utilisation de DMSO lors de leur cryoconservation (Chow-shi-yée *et al.*, 2020), mettant en évidence le potentiel d'application des mécanismes de tolérance au gel du blé pour améliorer la survie de cellules animales dans de telles applications.

Cette découverte fait suite à d'autres travaux de recherche ayant été effectués avec des extraits protéiques bruts de blé acclimaté ayant obtenus un effet positif sur la survie de cellules dérivées du pancréas de rat sécrétant l'insuline (INS832/13) et d'hépatocytes de rat (Grondin *et al.*, 2013; Hamel *et al.*, 2006). Ces tests ont par la suite donné lieu à l'identification de 2 nouvelles protéines cryoprotectrices du blé, l'énoïase TaENO (Uniprot : M4Q9V0) et TaBAS1 (Uniprot : P80602), par spectrométrie de masse en tandem (Grondin *et al.*, 2015). L'énoïase du blé TaENO est une enzyme impliquée dans la glycolyse, processus essentiel pour la production d'énergie dans les cellules par catalyse de la réaction menant à la production d'ATP (adénosine triphosphate). La protéine TaENO représente l'élément central la présente étude en raison de deux aspects principaux. D'une part, elle ne présente pas de domaines cryoactifs connus identifiables par des analyses bioinformatiques, et d'autre part, elle a démontré une activité notable d'inhibition de la recristallisation de glace (IRI) dans des tests réalisés sur des hépatocytes et des cellules INS (Chow-shi-yée *et al.*, 2016). La 2-Cys peroxyrédoxine BAS1 du blé, nommée TaBAS1 est une protéine associée à la réponse au stress et aux mécanismes de défense chez le blé catalysant des réactions de réduction des espèces réactives de l'oxygène (ROS). En plus de ces deux protéines, deux protéines préalablement caractérisées pour leurs effets sur l'augmentation de la résistance au stress lié au froid *in planta* (Griffith *et al.*, 2005; Houde *et al.*, 1995; Ouellet *et al.*, 1998; Tremblay *et al.*, 2005), à savoir TaIRI-

2 et WCS120, ont été utilisées dans les tests visant la mise en évidence de potentiels effets cryoprotecteurs par l'ajout des protéines purifiées au milieu de congélation de cellules mammifères (Chow-shi-yée *et al.*, 2016a; Chow-shi-yée *et al.*, 2016b; Chow-shi-yée *et al.*, 2020). WCS120 est une déhydrine appartenant à la famille des LEAs, elle aide à stabiliser les structures cellulaires et les protéines chez les plantes en conditions de stress. TaIRI-2 est une protéine IRI (*Ice recrystallisation inhibition*) du blé qui protège les cellules contre les dommages liés au gel en inhibant la croissance des cristaux de glace, réduisant ainsi les ruptures cellulaires et préservant l'intégrité cellulaire (Jin *et al.*, 2022). (Jin *et al.*, 2022). La déhydrine WCS120, la protéine d'inhibition de la recrystallisation de glace TaIRI-2, l'énolase TaENO, et l'antioxydant 2-Cys peroxyrédoxine TaBAS1 ont ainsi été mises de l'avant comme des protéines dont l'activité cryoprotectrice pouvait avoir une application auprès de cellules animales, offrant une perspective de remplacement des cryoprotecteurs classiques souvent cytotoxiques (Chow-shi-yée *et al.*, 2020). Si l'activité de certaines de ces protéines a été caractérisée *in planta* (Griffith *et al.*, 2005; Houde *et al.*, 1995; Tremblay *et al.*, 2005), leur effet cryoprotecteur et potentielle application auprès de différents types cellulaires est encore à caractériser, ce qui est un processus chronophage demandant l'étude des effets et réactions obtenus auprès de plusieurs types cellulaires en vue d'une utilisation potentielle comme cryoprotecteur commun.

1.5 Différents modèles pour les tests de cryoconservation

Les sections suivantes présentent les modèles vivants utilisés dans le cadre de ce projet de maîtrise, en détaillant leurs caractéristiques biologiques et leur pertinence scientifique. Ces modèles, mis à disposition dans le cadre des travaux, ont orienté le développement des expériences pour répondre aux objectifs du projet tout en tirant parti des ressources disponibles.

1.5.1 Modèle procaryote, *Escherichia coli*

1.5.1.1 Généralités

Escherichia coli est un organisme unicellulaire procaryote retrouvé dans la flore intestinale d'un grand nombre d'animaux (Blount, 2015). Cette bactérie est dotée d'une croissance rapide avec environ une division cellulaire par intervalle de 20 minutes dans les conditions de développement optimales (37°C, milieu riche type *Lysogeny-Broth*) permettant une culture facilitée. *E. coli* est un organisme robuste capable de survivre à des conditions variées grâce à des réponses d'adaptation efficaces comprenant l'accumulation de mutations bénéfiques au fil des générations, la capacité de produire des biofilms

résistants ainsi qu'une grande tolérance nutritionnelle (Blount, 2015). Les souches d'*E. coli*, grâce à l'ingénierie métabolique et aux techniques de transformation bactérienne, sont utilisées comme usine cellulaire pour la synthèse de divers composés d'intérêt industriel ou pharmaceutique. Cela inclut la production de biocarburants, de polymères, de métabolites secondaires et de métabolites pour les applications pharmaceutiques, agrochimiques et alimentaires. Parmi ces applications, les bactéries comme *E. coli* sont souvent utilisées dans le but de produire rapidement des protéines d'intérêt qui seront ensuite purifiées pour des applications à d'autres organismes. Une majorité de l'insuline humaine destinée au traitement des patients diabétiques est notamment produite par l'utilisation de souches de *E. coli* (Baeshen *et al.*, 2014; Nilsson *et al.*, 1996). La robustesse, la polyvalence et la facilité de manipulation d'*E. coli* en ont fait un des organismes les plus intensivement étudiés (Blount, 2015; Goodsell, 2009) souvent comme modèle pour l'expérimentation.

1.5.1.2 Intérêt comme modèle pour tests de cryoconservation

E. coli est un modèle bactérien hautement disponible, très bien étudié et dont la manipulation est facilitée par le faible coût d'entretien lié à sa culture. La cryoconservation de souches de *E. coli* est un procédé fréquemment utilisé dans les laboratoires. En général, l'ajout de glycérol pour atteindre une concentration de 10% dans le milieu de congélation permet d'assurer la survie des cultures à des températures entre -20°C et -196°C sur de longues durées (Kim *et al.*, 2009; Souzu, 1980). Certaines souches d'*E. coli* ont aussi prouvé pouvoir rester viables après exposition à des températures négatives pendant plusieurs semaines ou à des cycles de gel/dégel répétés (Dykes, 2000; Walker *et al.*, 2006). La survie des souches de *E. coli* cryoconservées est nécessaire pour la reproductibilité et l'établissement de certaines études à long terme, ce qui motive la caractérisation des causes principales de sa diminution. Les bactéries comme *E. coli* subissent des atteintes similaires à celles vécues par les cellules animales lors des cycles de gel/dégel imposés par la cryoconservation et malgré leur résistance naturelle peuvent aussi voir leur survie grandement diminuée en l'absence de cryoprotecteurs (Calcott et MacLeod, 1975). En raison de ces similitudes, *E. coli* constitue un modèle pertinent pour les tests préliminaires de cryoconservation, offrant un aperçu des défis liés à la survie bactérienne et au rôle des cryoprotecteurs.

E. coli est couramment utilisé pour la production de protéines recombinantes, offrant une plateforme simple et efficace pour générer des protéines émergentes à des fins d'étude. Concernant TaENO, des études ont démontré sa capacité à diffuser dans des hépatocytes (Chow-shi-yée *et al.*, 2016), suggérant que ses effets cryoprotecteurs pourraient partiellement résulter d'interactions intracellulaires. Cependant,

aucune donnée préalable ne confirme que TaENO pourrait diffuser dans *E. coli* si elle était ajoutée au milieu de congélation. Ainsi, la production de TaENO de manière endogène en utilisant le système bactérien, sans purification ni ajout exogène, a été privilégié. Cette approche limite le risque de perdre un potentiel effet intracellulaire, tout en facilitant les essais, en contournant les défis liés à la perméabilité de la paroi bactérienne.

1.5.2 Modèle eucaryote, cellules HeLa

1.5.2.1 Généralités

Les cellules HeLa sont un type de cellules très largement utilisé en laboratoire comme modèle de cellules humaines. Cette lignée cellulaire est dérivée des cellules cancéreuses du col de l'utérus prélevées auprès d'Henrietta Lacks en 1951. Ces cellules, capables de se développer rapidement et de se diviser indéfiniment en culture, constituent la première lignée cellulaire humaine immortalisée (Lyapun *et al.*, 2019). Comme pour une grande partie des cellules considérées cancéreuses, les cellules HeLa possèdent une mutation au niveau du gène p53 leur permettant d'échapper au contrôle de la croissance cellulaire. En effet, le gène p53 est un gène essentiel dans la régulation de la prolifération cellulaire pouvant mettre un terme aux divisions cellulaires et induire l'apoptose chez les cellules comportant des dommages à l'ADN et dont les mécanismes de réparation n'ont pas abouti (Olivier *et al.*, 2010). Les cellules HeLa, bien qu'elles diffèrent des cellules humaines par leur capacité à croître indéfiniment en dehors d'un organisme, sont d'un grand intérêt pour la recherche en raison de leur similarité avec les cellules épithéliales humaines. Elles ont été utilisées pour tester la toxicité et les effets de certains composés en vue de tests cliniques. Elles ont également joué un rôle essentiel dans le développement du vaccin contre la polio, ce qui a permis de perfectionner les techniques de culture cellulaire. Leur utilisation a également contribué à la découverte de l'origine virale de certains cancers, notamment ceux causés par le papillomavirus, entraînant la mise au point d'un vaccin contre cette pathologie (Nott, 2020; Turner, 2012).

1.5.2.2 Intérêt comme modèle pour tests de cryoconservation

Les cellules HeLa sont une lignée répandue dans de nombreux laboratoires et dont l'utilisation est appuyée par une documentation abondante (Landry *et al.*, 2013; Nott, 2020) ainsi qu'une culture rapide facilitée par l'adaptabilité des cellules à une variété de milieux de culture standards (ex : DMEM) sans nécessiter de suppléments ou de conditions spécifiques (El Enshasy *et al.*, 2009). Leur utilisation est aussi facilitée par la possibilité de les cryoconserver avec un taux de survie acceptable permettant l'établissement d'études à

long terme ainsi qu'un gain de temps considérable au niveau du maintien de lignées spécifiques ou de modèles cellulaires obtenus par des techniques de transfection cellulaire (Murray et Gibson, 2022). La cryoconservation des cellules HeLa est conventionnellement accomplie par l'usage de DMSO (Diméthyl Sulfoxyde) et de SBF (Sérum Bovin Fœtal) sans lesquels les cellules subissent des dommages causés par le gel notamment au niveau de la membrane cellulaire résultant en des taux de survie grandement diminués. Ces substances, bien qu'offrant une protection aux cellules lors des variations de températures subies lors des protocoles de cryoconservation pour stockage à -196°C ou -80°C , ont été mises en lien avec des interférences potentiellement toxiques (Murray et Gibson, 2022; Planas-Paz et Pauli, 2021; Santos *et al.*, 2023) et menaçant la reproductibilité de certaines études. Ces interférences motivent la recherche de moyens de cryoconserver efficacement ces cellules en vue d'établir des bio-banques.

Les cellules HeLa par leur similarité avec les cellules épithéliales humaines présentent un grand intérêt en tant que modèle pour des tests destinés à des applications translationnelles. Ces cellules, comme des cellules normales, sont capables de produire des protéines, exprimer et réguler leurs gènes, communiquer avec les cellules avoisinantes et sont susceptibles aux infections/dommages. Il est donc possible pour les chercheurs d'utiliser ces cellules pour des applications autres que la recherche sur le cancer (Landry *et al.*, 2013; Mirabelli *et al.*, 2019).

1.5.3 Organoïdes

Les organoïdes constituent un modèle *in vitro* avec une organisation tridimensionnelle reproduisant de nombreux aspects de la structure et de la fonction d'un tissu *in vivo* correspondant. Les organoïdes sont obtenus par ingénierie cellulaire (Figure 1.3) à partir de cellules pluripotentes, de cellules souches (embryonnaires ou adultes), de cellules progénitrices ou de cellules différenciées provenant de tissus (Zhao *et al.*, 2022). Les organoïdes sont composés de différents types cellulaires composant normalement les tissus qu'ils sont développés pour imiter, ajoutant un niveau de complexité en tant que modèle par rapport aux cultures de cellules simples en deux dimensions. En effet, la culture en 2D tend à provoquer une perte de forme et de structure hiérarchique des cellules, altérant la transduction des signaux entre les cellules ainsi qu'entre les cellules et leur environnement extracellulaire. Ce phénomène mène à des cellules ne reproduisant pas correctement les fonctions et comportements cellulaires présents dans les tissus ou organes *in vivo* (Yang *et al.*, 2023), phénomène absent des cultures d'organoïdes. Les cultures d'organoïdes sont néanmoins la plupart du temps démunies de systèmes stromaux, vasculaires et immunologiques, présentent une hétérogénéité significative et une complexité variable dans leur

composition cellulaire (Zhao *et al.*, 2022). Leur disponibilité accrue par rapport aux modèles animaux ainsi que les raisons éthiques relatives aux sacrifices des modèles animaux en ont fait un type de modèle prisé par les chercheurs pour des applications telles que la modélisation de maladies, le criblage de médicaments, les tests de toxicité, la médecine personnalisée, l'établissement de bio-banques, la découverte de biomarqueurs et la médecine régénérative (Yang *et al.*, 2023).

1.5.3.1 Organoïdes cérébraux humains

Les organoïdes cérébraux humains sont générés à partir de cellules souches pluripotentes humaines (hPSC) s'auto-assemblant pour former une structure 3D dont l'organisation est similaire à celle d'un cerveau fœtal humain. Comme ce dernier, ils sont constitués de cellules progénitrices, de cellules neuronales et gliales (Qian *et al.*, 2019). Plusieurs méthodes peuvent mener à la formation d'organoïdes cérébraux différenciés pour imiter des régions spécifiques du cortex cérébral. Ces méthodes peuvent être divisées en deux groupes : les méthodes guidées où l'ajout de signaux externes induit la différenciation des cellules en lignées désirées et les méthodes non-guidées qui dépendent de la capacité de morphogénèse et de différenciation spontanées des agrégats de cellules pluripotentes (Qian *et al.*, 2019).

Ces méthodes mènent aujourd'hui à la possibilité de développer des organoïdes organisés en tissus ressemblant au cerveau antérieur (dorsal et ventral), au cervelet, au cortex (dorsal et ventral), à l'hippocampe, au plexus choroïde, au mésencéphale, à l'hypothalamus, au pallium et au sous-pallium (Mohamed *et al.*, 2021). Ces organoïdes ont une taille réduite par rapport au cerveau humain, atteignant jusqu'à 4 mm pour les plus grands. Les neurones les composant sont dans une grande partie des cas fonctionnels mais moins matures que des neurones adultes. Étant des modèles des premiers stades du développement embryonnaire, leurs paramètres de fonctionnalité et de maturation varient, montrant une activité électrique plus développée chez les organoïdes plus matures, avec des potentiels d'action et des courants synaptiques (Mohamed *et al.*, 2021; Qian *et al.*, 2019).

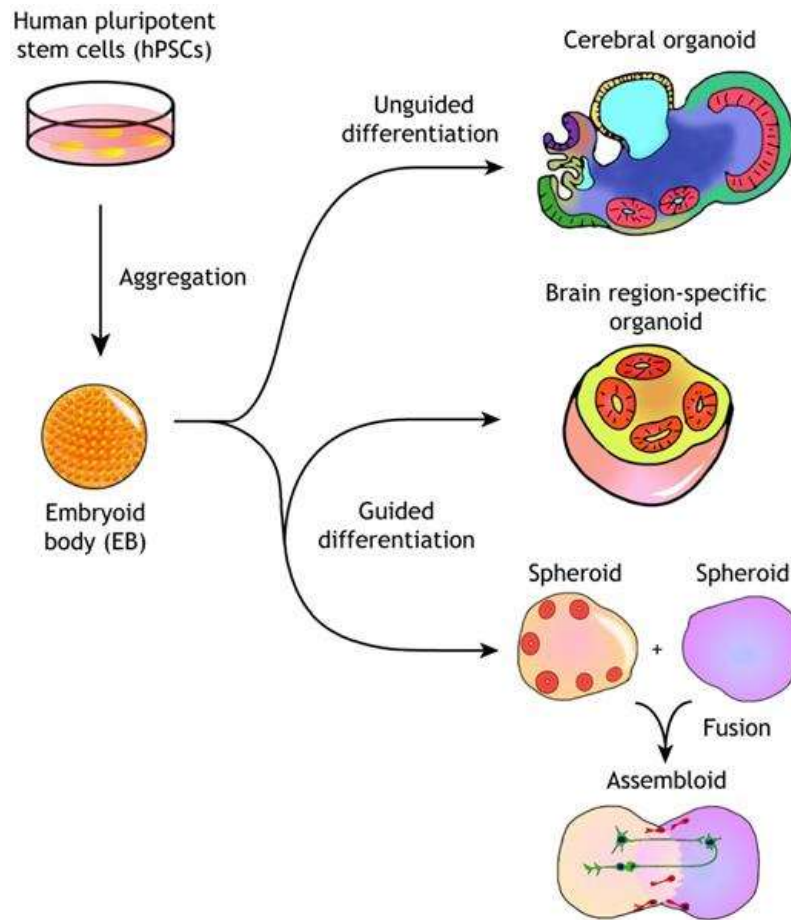


Figure 1.3 : Approches utilisées dans le développement d'organoïdes cérébraux (Qian *et al.*, 2019)

Les organoïdes cérébraux sont utilisés pour étudier des pathologies comme la microcéphalie (Lancaster *et al.*, 2013), le virus Zika, les troubles du spectre autistique et plus récemment certains troubles neurodégénératifs comme la maladie d'Alzheimer (Mohamed *et al.*, 2021). Les organoïdes cérébraux dérivés de hPSCs, notamment les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) dérivées de patients, modélisent efficacement les troubles neurodéveloppementaux en reproduisant les phénotypes de maladies avec des malformations structurelles précoces et permettant l'analyse des mécanismes de régulation perturbés des cellules progénitrices, tels que la différenciation prématurée, la prolifération réduite et la perturbation du cycle cellulaire (Qian *et al.*, 2019).

Avec la facilitation des méthodes de production d'organoïdes cérébraux, leur intérêt croissant comme modèle d'études pour les pathologies du cerveau ainsi que le coût financier, en temps et humain lié à leur production, le besoin d'une méthode de stockage efficace pour ce modèle est devenu une problématique

de recherche importante des dernières années. Si des stades de développement intermédiaires ont pu être cryoconservés avec succès pour permettre la génération d'organoïdes en aval, la cryoconservation des organoïdes matures doit encore être améliorée pour permettre une utilisation sans besoin de remise en culture et différenciation (Li *et al.*, 2020; Mayhew et Singhanian, 2023). La grande complexité de la structure des organoïdes et l'hétérogénéité de leur composition cellulaire posent des défis liés à la distribution des cryoprotecteurs, à la réponse distincte des cellules aux milieux de congélation et aux blessures induites par le gel/dégel. Le manque de méthodes de contrôle de qualité adéquates pouvant assurer l'évaluation de la récupération des organoïdes en temps voulu sans processus de re-culture prolongé, représente un autre défi limitant la reproductibilité des expériences faites auprès de ce modèle (Rogulska *et al.*, 2023). Le cerveau humain étant un organe dont la cryoconservation est encore inatteignable, l'amélioration des techniques de cryoconservation de modèles représentatifs de sa complexité pourrait servir de tremplin à des découvertes liées.

1.5.3.2 Organoïdes pancréatiques humains

Avec l'incidence actuelle de maladies pancréatiques comme le diabète et les pancréatites, un grand intérêt a été porté sur l'amélioration du développement d'organoïdes pouvant modéliser le fonctionnement et les propriétés structurales du tissu pancréatique humain. Les organoïdes de pancréas peuvent être développés à partir de hPSCs en culture auxquels sont ajoutés des facteurs de croissance spécifiques ainsi que de petites molécules menant à la différenciation des hPSCs en cellules pancréatiques dont notamment des îlots de cellules bêta responsives au glucose (Hohwieler *et al.*, 2019). Les cellules bêta sont un des quatre types cellulaires retrouvés dans les îlots pancréatiques avec les cellules alpha responsables de la sécrétion de glucagon, les cellules delta sécrétant la somatostatine et les cellules PP sécrétant le polypeptide pancréatique. Les cellules bêta sont responsables de la sécrétion de l'insuline, leur destruction par le système immunitaire est la cause de l'apparition du diabète de type 1 chez les patients atteints (Huang *et al.*, 2020). La transplantation d'îlots est un traitement approuvé pour le diabète de type 1. Les îlots provenant de donneurs peuvent remplacer la fonction de sécrétion d'insuline perdue à cause de la destruction auto-immune des cellules bêta pancréatiques mais leur disponibilité est une des limites principales à ce type de thérapie. La production de cellules bêta sécrétant de l'insuline à partir de cellules souches pluripotentes (PSCs) est une solution potentielle aux problèmes d'approvisionnement des donneurs pour la transplantation d'îlots (Tran *et al.*, 2020).

La transplantation d'un nombre suffisant d'îlots pancréatiques viables, fonctionnels et de haute qualité chez un patient atteint de diabète peut mener à une guérison. Une des limites principales à la mise en œuvre de cette transplantation est l'absence de ressources suffisantes en îlots natifs ou en cellules souches dérivées souvent liée à l'incapacité de stocker ces derniers en vue de leur utilisation (Zhan *et al.*, 2022). Les organoïdes pancréatiques, comme les îlots pancréatiques natifs, ont une structure multicellulaire en faisant une structure dont la cryoconservation efficace est plus compliquée à atteindre que les cultures de cellules uniques. Certaines études se sont penchées sur la remise en culture de cellules uniques dispersées à partir de tissus pancréatiques et obtiennent pour l'instant de meilleurs résultats que les tentatives de cryoconservation effectuées auprès de structures pluricellulaires (Rawal *et al.*, 2017). Dans le cadre de l'établissement d'une biobanque de matériel utilisable pour une transplantation, une remise en culture en vue d'une réagrégation des cellules en sphéroïdes/organoïdes est à éviter pour diminuer les coûts et le temps associés. Les ressources en îlots pancréatiques natifs étant déjà limités pour l'usage en transplantation, la recherche de l'amélioration de sa cryoconservation doit se faire par l'usage de modèles. Les modèles murins ont souvent été utilisés mais ne représentent pas l'ensemble des voies de signalisation, de la structure et du métabolisme des îlots humains. Les organoïdes pancréatiques développés à partir de hPSCs présentent une opportunité pour les chercheurs d'avoir un modèle représentatif (taille, structure, composition, métabolisme) en vue de tests translationnels.

1.6 Étude présente

1.6.1 Problématique

Avec l'émergence de nouveaux modèles cellulaires plus complexes et le problème actuel du gaspillage de certaines ressources biologiques dont la cryoconservation est encore inatteignable, un besoin d'amélioration des techniques de préservation utilisées couramment est rencontré. Si l'établissement de bio-banques de matériel de haute qualité pouvant être utilisé pour des applications de recherche voire cliniques est prometteur, ces dernières se doivent d'être capables de préserver pendant de longues durées des échantillons fonctionnellement et structurellement complexes. Pour améliorer les protocoles de cryoconservation couramment utilisés en laboratoire, l'usage de cryoprotecteurs cytotoxiques comme le DMSO doit être diminué, mettant de l'avant l'utilisation de composés d'origine naturelle améliorant la survie et le maintien des fonctions de différents types cellulaires.

1.6.2 Hypothèse et Objectifs

L'hypothèse soutenue est que les protéines du blé (*Triticum aestivum*) précédemment caractérisées comme pouvant améliorer la survie et le maintien des fonctions de certains types cellulaires peuvent constituer une alternative aux cryoprotecteurs classiques (ex : DMSO, glycérol, ...) pour la cryoconservation de différents types cellulaires et de modèles cellulaires plus complexes. Les objectifs qui en découlent portent sur l'estimation des effets de ces protéines sur la survie de différents modèles et l'identification du domaine cryoactif de la protéine TaENO.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Transformation et production des protéines recombinantes

Les cDNA des protéines d'intérêt ont été amplifiés par PCR (réaction en chaîne par polymérase) à partir d'une bibliothèque d'ADNc de blé (*Triticum aestivum* L. cv Norstar) obtenue comme décrit (Grondin et al., 2009), clonés dans le vecteur pTrcHisB (Annexe A) et confirmés par analyse de séquence. Parmi les séquences d'ADN codantes isolées, celle de la protéine TaENO a été utilisée comme gabarit pour amplifier par PCR des fragments codant différentes portions de la protéine complète (TaENO-FL), conduisant à l'obtention d'ADNc tronqués (Figure 3.2-A, Annexes B et C). Les ADNc des protéines complètes et fragments de protéines obtenus ont ensuite été clonés dans le vecteur pTrcHisB (Invitrogen) pour l'expression de protéines inducible par l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) chez *E. coli*. Les bactéries transformées ont été cultivées dans un milieu LB supplémenté avec 50 μ g/mL d'ampicilline et l'expression a été induite avec 1 mM d'IPTG pendant 4 heures. Les cultures résultantes ont été centrifugées à 14 000 RPM (*revolutions per minute* -Tours par minutes), pendant 20 min à 4°C menant à l'obtention de culots bactériens qui ont été resuspendues dans un tampon de liaison adapté (Tris-HCl 50 mM NaCl 200 mM et Imidazole 10 mM) puis soniqués sur glace à l'aide d'un sonicateur à ultrasons permettant la lyse des bactéries et ainsi la libération des protéines. Des étapes de centrifugation subséquentes ont été réalisées pour mener à l'élimination des débris bactériens, le surnageant a été conservé et correspond aux extraits protéiques à purifier. Les protéines résultantes ont été purifiées par chromatographie d'affinité aux métaux immobilisés (IMAC) utilisant le cobalt comme ligand, sur un système BioLogic DuoFlow (BioRad Laboratories Ltd., Mississauga, ON). La purification des protéines sur le système a été effectuée comme suit : les protéines suspendues dans le tampon de liaison ont été chargées au sein de la colonne d'affinité, puis éluées progressivement à l'aide d'un mélange de tampon de liaison et de tampon d'éluion (Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, Imidazole 500 mM) de façon à ce que les pourcentages de tampon d'éluion augmentent par paliers (5, 10, 25, 50, 75, et 100 %), permettant ainsi de dissocier les protéines liées à la colonne selon la force croissante de leur interaction avec le cobalt. Les fractions obtenues contenant les protéines d'intérêt ont été identifiées à l'aide de la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 280 nm réalisée par le système, puis ont été regroupées à partir de plusieurs essais, dialysées (Spectrum™ Spectra/Por™ 4 RC Dialysis Membrane Tubing 12,000 to 14,000 Dalton MWCO) contre de l'eau, et finalement lyophilisées. La qualité a été confirmée par analyse des protéines par électrophorèse SDS-PAGE

(électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS)) sur gel contenant 12% de polyacrylamide contenant 1% de TCE (Trichloroéthanol). Le TCE a permis la détection des protéines par fluorescence UV à l'aide d'un appareil Alphalmager (AlphaInnotech).

2.2 Analyse de séquence et prédictions informatiques

Les résultats de séquençage obtenus pour le vecteur pTrcHisB contenant l'ADNc de la protéine TaENO-FL ont été analysés sur la plateforme Benchling. Un alignement des séquences a été réalisé à l'aide de la méthode Clustal Omega (Sievers et Higgins, 2018) afin de générer une séquence consensus de l'ADNc complet et de ses fragments définis. Ces données ont servi à prédire les propriétés des protéines produites et à évaluer leur homologie avec des séquences publiées (Annexe B). Les alignements de séquences ont été effectués sur Benchling en utilisant la méthode d'alignement de Clustal Omega (Sievers et Higgins, 2018), permettant de comparer les similarités conservées et de valider les relations entre la protéine étudiée et celles référencées dans les bases de données. Les protéines TaBAS1 (EnsemblPlants - TraesCS2D02G295500), WCS120 (GenBank accession M93342), et TaIRI-2 (GenBank accession AY968589), préalablement produites dans le laboratoire par expression bactérienne et purifiées par IMAC au cobalt selon notre protocole préalablement décrit, ont été soumises à des validations similaires à celles présentées, effectuées par d'autres membres de l'équipe.

La structure tridimensionnelle des protéines a été prédite à l'aide d'AlphaFold (ColabFold v1.5.5 : AlphaFold2) (Jumper *et al.*, 2021) pour générer des modèles de haute qualité. Les visualisations ont été réalisées à l'aide de PyMOL (Schrödinger, LLC) pour l'illustration et la présentation des structures, permettant une représentation de l'organisation spatiale des protéines.

2.3 Tests avec le modèle *E. coli*

2.3.1 Tests de cryoconservation avec TaENO chez *E. coli* – Approche par comptage de colonies sur milieu solide

Les étapes décrites dans le paragraphe suivant sont schématisées dans la figure 2.1. Les bactéries transformées avec le vecteur d'expression pTrcHisB (Annexe A) contenant les ADNc des fragments de TaENO ainsi que de la version totale ont été cultivées en doublon dans un milieu LB supplémenté avec 50 µg/mL d'ampicilline, l'expression protéique a été induite avec 1 mM d'IPTG pendant 4 heures pour un seul des tubes de chaque doublon. La densité des cultures a été égalisée par lecture de la densité optique à 600 nm et chacune des cultures a été divisée en un groupe témoin non-congelé et un groupe test destiné

à être congelé. Le groupe témoin a été étalé en deux concentrations sur milieu solide LB-agar supplémenté avec 50 µg/mL d'ampicilline puis mis en culture 24 heures à 37°C pour comptage des colonies. Le groupe test a été supplémenté de glycérol pour atteindre 4 concentrations différentes du cryoprotectant (0, 5, 10 et 15%), choisies pour évaluer l'effet dose-dépendant du cryoprotecteur sur la survie des bactéries en relation avec la présence de la protéine d'intérêt. Les cultures ont ensuite été placées dans des cryotubes et congelées par dépôt dans un bain de glace sèche-éthanol et stockées à -80°C pour une période de 24 à 48 heures. Les tubes ont été dégelés (24°C, 10-15 minutes), chaque condition a été étalée en deux concentrations (équivalentes à celles du groupe témoin) sur milieu solide LB-agar supplémenté avec 50 µg/mL d'ampicilline puis mis en culture 24 heures à 37°C pour comptage des colonies. La survie de chaque condition du groupe test a été estimée par comparaison du nombre de colonies obtenues sur les géloses du groupe test par rapport aux géloses du groupe témoin correspondant.

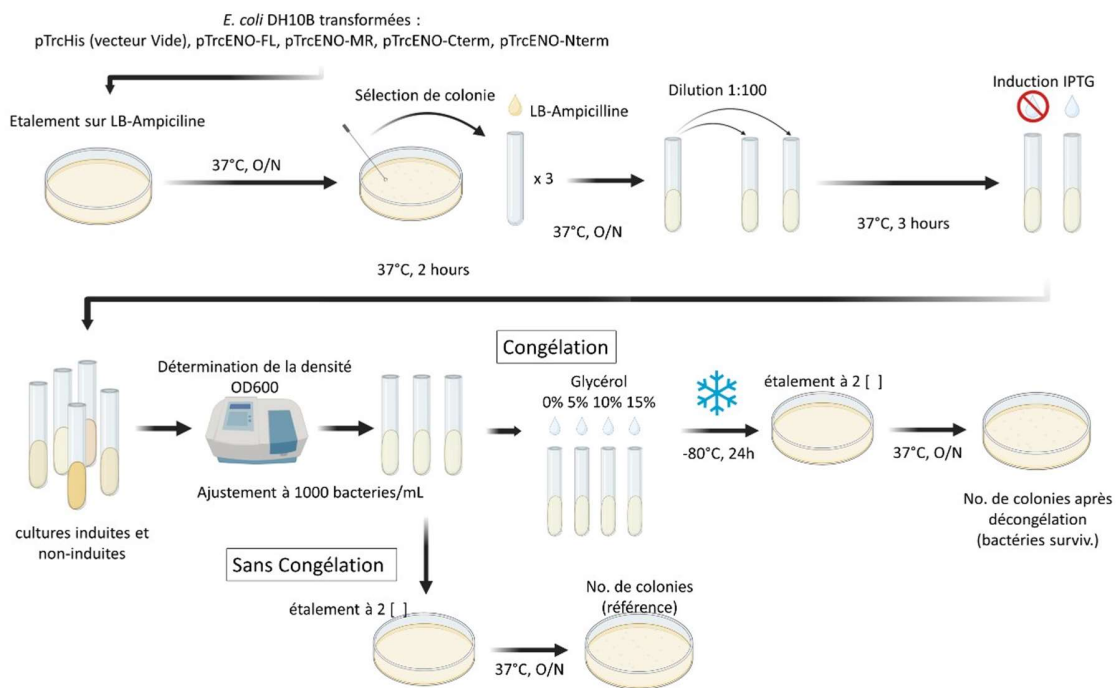


Figure 2.1 : Méthodologie des tests de cryoconservation effectués avec *E. coli* sur milieu solide

Figure réalisée à l'aide du logiciel BioRender.

2.3.2 Tests de cryoconservation avec TaENO chez *E. coli* – Approche par cytométrie en flux

Les étapes décrites dans le paragraphe suivant sont schématisées dans la figure 2.2. Les bactéries transformées avec le vecteur d'expression pTrcHisB contenant le cDNA des fragments de TaENO ainsi que de la version totale ont été cultivées en double dans un milieu LB supplémenté avec 50 µg/mL d'ampicilline, et l'expression protéique a été induite avec 1 mM d'IPTG pendant 4 heures pour un seul des tubes du double. Les cultures ont été ajustées à une densité de 10^6 cellules/mL à l'aide des microsphères standards fournies dans la trousse de comptage bactérien (*Bacteria Counting Kit, for flow cytometry* – Invitrogen) et d'un cytomètre en flux (BD Accuri C6). Une fois cette densité obtenue, chaque culture a été divisée en deux groupes : un groupe témoin non congelé et un groupe test destiné à être congelé. Aux tubes du groupe témoin ont été ajoutées deux sondes fluorescentes : le SytoBC fourni avec la trousse (*Bacteria Counting Kit, for flow cytometry* – Invitrogen) pour le comptage des cellules et l'iodure de propidium (PI) pour l'estimation de la viabilité. Le groupe test a été supplémenté de glycérol pour atteindre 4 concentrations différentes du cryoprotectant, 0, 5, 10 et 15%, congelé par dépôt dans un bain de glace sèche-éthanol et stocké à -80°C pour une période de 24 à 48 heures. Les tubes ont été dégelés à température pièce et complétés des deux sondes fluorescentes (SytoBC/PI) et des microsphères pour le comptage des cellules et l'estimation de leur viabilité. La survie de chaque condition du groupe test a été estimée par comparaison du pourcentage de signal positif au PI par rapport au signal observé dans la condition du groupe témoin correspondante.

2.4 Tests avec le modèle HeLa– TaENO

Les étapes décrites dans le paragraphe suivant sont schématisées dans la figure 2.3. Des cellules HeLa ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplémenté avec 10% de sérum de bovin fœtal (FBS), 1% de pénicilline-streptomycine et incubées à 37°C avec une humidité de 95% et 5% de CO₂ jusqu'à atteindre 80-100% de confluence dans un flacon T75 (Sarstedt Inc). Les cellules ont ensuite été lavées puis dissociées selon un protocole standard de détachement par trypsine (Trypsin-EDTA solution - Gibco). Les cellules détachées ont été resuspendues dans un volume de PBS (solution saline tamponnée au phosphate) adapté à l'expérience permettant d'atteindre une densité homogène au sein des tests. Un contrôle de viabilité est effectué en ajoutant deux sondes fluorescentes : la calcéine-AM (acétoxyméthyl ester) et le PI à une concentration de 1 µg/mL et 1 µg/mL respectivement auprès d'une suspension des cellules obtenue par prélèvement d'un volume équivalent à 1×10^6 cellules dans les cellules

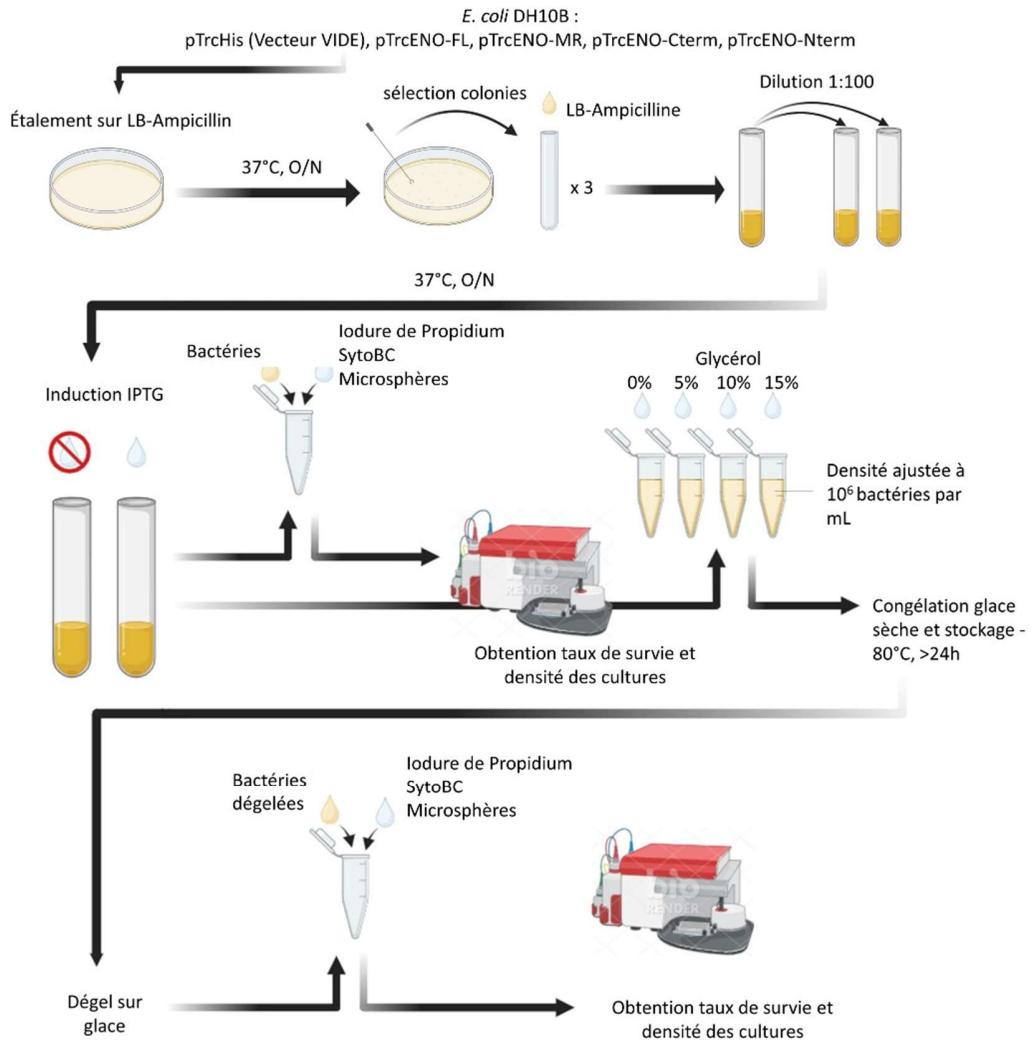


Figure 2.2 : Méthodologie des tests de cryoconservation effectués avec *E. coli* par cytométrie en flux

Figure réalisée à l'aide du logiciel BioRender.

détachées. Les cellules détachées restantes ont été divisées en volumes équivalents à 1×10^6 cellules puis resuspendues dans des cryotubes avec les composés correspondants aux tests suivants : un groupe suivant un protocole standard de cryoconservation de cellules, avec un milieu de congélation composé de 90% de FBS et 10% de DMSO, un groupe avec du milieu DMEM seulement comme milieu de congélation, un groupe test avec du milieu DMEM contenant 15 à 20 mg/mL de protéines d'intérêt comme milieu de

congélation et un groupe avec du milieu DMEM contenant 15 à 20 mg/mL de BSA (*Bovine Serum Albumin* – albumine de sérum bovin). Les cryotubes ont ensuite été placés dans un conteneur MrFrosty™ (*Mr. Frosty™ Freezing Container* – ThermoFisher Scientific) pendant 48h dans un congélateur à -80°C. Les cellules sont ensuite dégelées dans un bain thermostaté à 37°C, lavées et leur viabilité a été estimée par cytométrie en flux avec l'ajout des deux sondes fluorescentes : la calcéine-AM et le PI à une concentration de 1 µg/mL et 1 ug/mL respectivement.

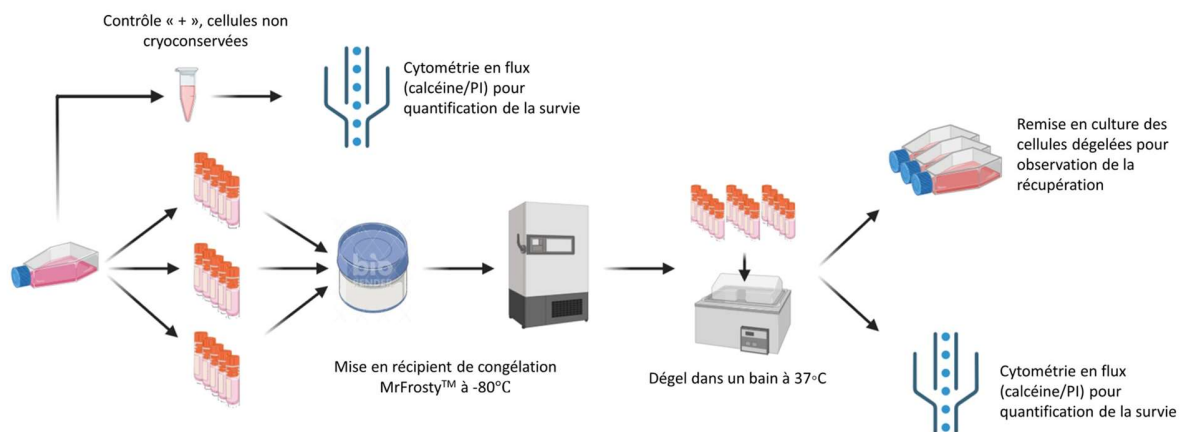


Figure 2.3 : Méthodologie des tests de cryoconservation réalisés avec les cellules HeLa par cytométrie en flux

Figure réalisée à l'aide du logiciel BioRender.

2.5 Tests auprès des organoïdes

2.5.1 Obtention et entretien des organoïdes

Les organoïdes de cerveau utilisés dans les tests ont été fournis par le laboratoire de Thomas Durcan de l'institut hospitalier neurologique de Montréal (NEURO) puis entretenus en plaque de 6 puits non-adhésifs et incubés à 37°C avec une humidité de 95% et 5% de CO₂ avec agitation jusqu'à l'utilisation en changeant le milieu FDM (*Final differentiation media* (Mohamed et al., 2022)) de façon hebdomadaire. Les organoïdes de pancréas ont été fournis par le laboratoire de Corinne Hoesli du département de génie chimique de l'université McGill et entretenus en plaque de 6 puits non-adhésifs et incubés à 37°C avec une humidité de 95% et 5% de CO₂ avec agitation jusqu'à l'utilisation en changeant de façon bijnournalière le milieu supplémenté avec un mélange de cofacteurs fourni par le laboratoire Hoesli.

2.5.2 Fixation des organoïdes

Pour préparer les organoïdes à des manipulations ultérieures, telles que la clarification ou la coupe histologique, et permettre l'immobilisation des phénomènes à observer, les organoïdes ont été fixés. Ils ont pour ce faire été plongés dans une solution de PFA (paraformaldéhyde) 4%. Les petits organoïdes (50-200 μm) ont été fixés pendant environ 30 minutes et les grands (>200 μm) pendant 1 à 2 heures. Après fixation, les organoïdes ont été rincés trois fois avec du PBS et stockés à 4°C pour une utilisation ultérieure.

2.5.3 Clarification des organoïdes

Pour permettre l'observation des cellules situées au centre des structures formées par les organoïdes, un protocole visant à la clarification (aussi appelé transparisation) de la structure a été effectué. Les organoïdes fixés ont été immergés dans une première solution (CUBIC-Reagent I : 25 % (p/p) urée, 25 % (p/p), N,N,N',N'-tétrakis (2-hydroxypropyl) éthylènediamine, 15 % (p/p) Triton X-100) à 37°C pendant 3 à 7 jours avec agitation et un changement de solution tous les 3 jours, puis lavées et immergées dans la deuxième solution (CUBIC-Reagent II : 50 % (p/p) sucrose, 25 % (p/p) urée, 10 % (p/p) Triethanolamine, 0.1 % (v/v) Triton X-100) à 37°C pendant 3 à 7 jours avec agitation et changement journalier de la solution (Annexe E : CUBIC *Tissue Clearing Protocol*).

2.5.4 Tests de diffusion des protéines d'intérêt marquées avec l'Oregon Green

Les protéines d'intérêts lyophilisées ont été solubilisées (4 mg/mL) dans du PBS. Un volume de la solution de protéines (500 μL - 2mg) ainsi que 50 μL d'une solution à 1M de bicarbonate ont été ajoutées au tube contenant la sonde Oregon Green en suivant les étapes de la trousse (Oregon Green 488 Antibody/Protein Labeling Kit – ThermoFisher Scientific). Le mélange a été agité pendant 1 heure à température ambiante dans l'obscurité. La protéine marquée a ensuite été déposée sur une résine de purification (Sephadex G-75), et l'élution de la protéine a été suivie par illumination avec une lampe UV. Les protéines marquées résultantes ont été quantifiées et diluées pour obtenir une concentration utilisable dans les tests. Les organoïdes cultivés selon les protocoles standards ont été incubés en présence de protéines marquées à une concentration relative d'1 mg par organoïde pendant les durées suivantes : 30 min, 1 heure, 2 heures, 4 heures et 6 heures. Les organoïdes ont ensuite été fixés en utilisant un protocole standard de fixation avec PFA. L'observation de la diffusion des protéines a été effectuée par microscopie confocale à fluorescence sur des organoïdes entiers clarifiés en utilisant un protocole de transparisation (Annexe E) et

sur des coupes histologiques (~50 µm) réalisées à l'aide d'un microtome à cryostat (CM1950 Cryostat – Leica) après marquage pour observation au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole).

2.5.5 Cryoessais réalisés avec les organoïdes

2.5.5.1 Tests de viabilité après cryoconservation

Les étapes décrites dans le paragraphe suivant sont schématisées dans la figure 2.4. Les organoïdes cultivés selon les conditions standards (Mohamed *et al.*, 2022; Tran *et al.*, 2020) ont été incubés en présence de protéines d'intérêt à des concentrations et temps variables dépendamment des tests à effectuer et du type d'organoïde concerné (tests indiqués dans le tableau 2.1). Parmi les tests, certains ont été réalisés en présence du produit commercial de cryoconservation 3dGRO (Annexe F - *Organoid Freeze Medium* – Sigma-Aldrich). Après incubation, les organoïdes et leur milieu de congélation ont été placés dans un cryotube au sein d'un MrFrosty™ pendant 24h dans un congélateur à -80°C puis transférés dans l'azote liquide pendant une semaine. Les organoïdes ont ensuite été dégelés dans un bain thermostaté à 37°C, rincés trois fois avec du PBS, puis remis en culture pour permettre leur rétablissement pendant 24 à 48 heures. Ils ont ensuite été marqués avec les sondes fluorescentes permettant l'estimation de la viabilité (Calcéine/OliveGreen557/PI) puis fixés en utilisant un protocole standard de fixation avec PFA. L'observation de la viabilité des organoïdes a été effectuée par microscopie confocale à fluorescence sur des organoïdes entiers clarifiés et sur des coupes histologiques comme décrit précédemment.

2.5.5.2 Test CAS-3 clivée

Les cryosections obtenues à partir des organoïdes, préalablement soumises au test de viabilité, ont été lavées avec une solution de glycine 0,1 M (pH 2,2) pendant 10 minutes pour enlever les sondes précédemment appliquées (*stripping* – élution/dépouillement). Les coupes ont ensuite été lavées 3 fois avec du PBS puis incubées dans un tampon de blocage contenant 5% de sérum (BSA) et 0,3% de Triton X-100 pendant 1 heure à température ambiante. Les coupes ont été incubées avec l'anticorps Cleaved Caspase-3 (Asp175) (#9661 - Cell Signaling Technology), dilué à 1:200 dans le tampon de blocage, pendant la nuit à 4°C. Les coupes ont été lavées trois fois avec du PBS, puis incubées avec un anticorps secondaire conjugué à un fluorophore (Alexa Fluor) pendant 1 heure à température ambiante. Après plusieurs lavages au PBS, les coupes ont été montées avec un milieu de montage (PVA 10%) contenant du DAPI (1 µg/mL) pour la contre-coloration des noyaux, puis analysées en microscopie à fluorescence.

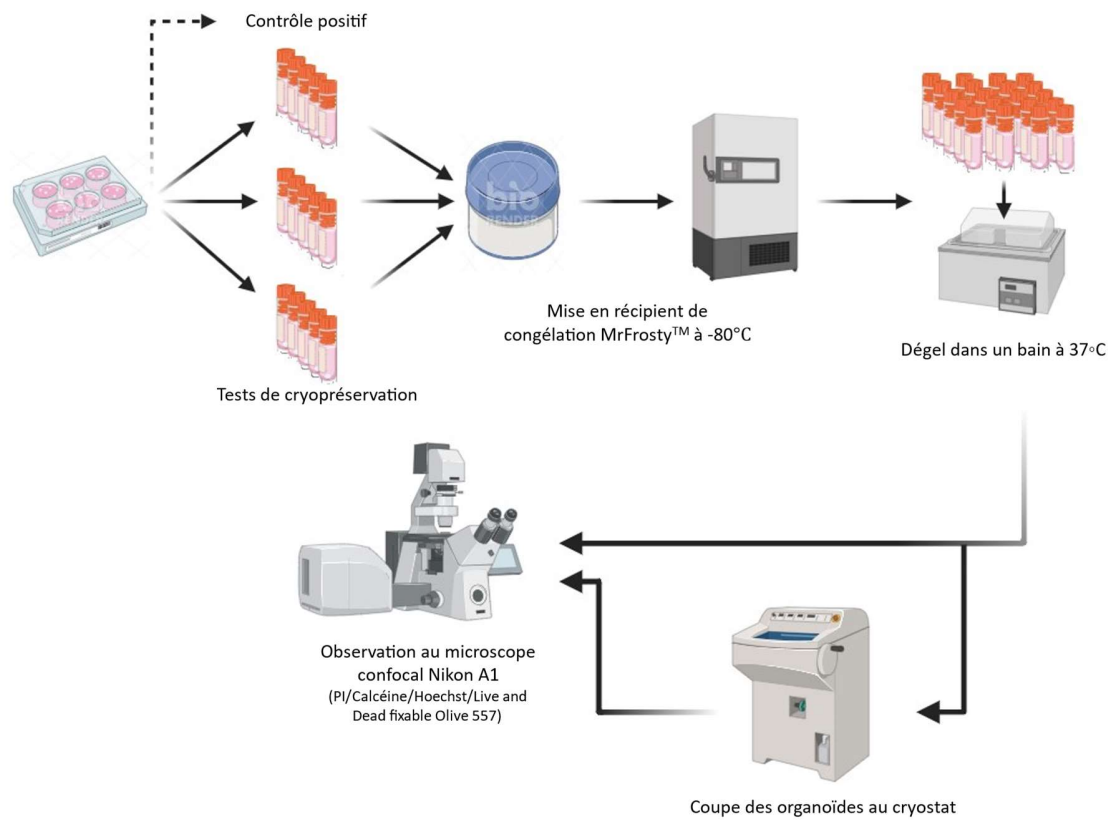


Figure 2.4 : Méthodologie utilisée pour les tests de cryoconservation avec les organoïdes

Figure réalisée à l'aide du logiciel BioRender.

Tableau 2.1 : Cryoessais effectués avec des organoïdes de cerveau et de pancréas

Test	Organoïde de cerveau	Organoïdes pancréatiques
• 3DGRO	✓*	✓**
• DMSO - 5%	✓	×
• DMSO - 10%	✓	✓**
• BSA - 1mg	✓	×
• BSA - 0,5mg	✓	×
• TaBAS - 1mg	✓*	✓**
• TaBAS - 0,5mg	✓	×
• TaENO - 1mg	✓*	✓**
• TaENO - 0,5mg	✓	×
• WCS120 - 1mg	✓*	✓**
• WCS120 - 0,5mg	✓	×
• TaIRI - 1mg	✓*	✓**
• TaIRI - 0,5mg	✓	×
• WCS120+TaBAS - 0,5mg chq	✓	×
• WBTE - 0,25mg chq	✓	✓**
• WBT - 0,33mg chq	✓	✓**

La partie supérieure du tableau présente les tests effectués en guise de contrôle (négatifs/positifs), la partie inférieure présente les tests effectués en utilisant les protéines d'intérêt comme CPAs. Les quantités affichées représentent la quantité de protéines présentes dans les 250 uL du milieu de congélation. Les tests ont été effectués auprès d'un organoïde ($n \geq 3$). ✓ : test effectué ; × : test non-effectué ; ✓* : test effectué auprès de 1, 2 et 3 organoïdes ; ✓** : test effectué auprès de 10, 20 et 50 organoïdes. WBT : WCS120, TaBAS1 et TaIRI-2 ; WBTE : WCS120, TaBAS, TaIRI et TaENO. Chq : quantité par test pour chacune des protéines.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

Les protocoles de cryoconservation doivent prendre en compte plusieurs paramètres et être respectés rigoureusement pour garantir une viabilité optimale des cellules ou tissus à préserver. Un des premiers indicateurs d'une cryoconservation réussie réside dans le taux de survie observé dans les échantillons dégelés qui doit être le plus proche de la viabilité de l'échantillon avant congélation. Cette étude implémente plusieurs méthodes pour évaluer les effets cryoprotecteurs de protéines de blé préalablement établies comme alternatives potentielles aux CPAs toxiques utilisés conventionnellement auprès de différents modèles vivants. La viabilité est le principal facteur mesuré au cours des expériences réalisées, cette approche préliminaire a pour but de minimiser les tests plus complexes qui viseront à estimer la fonctionnalité des modèles suite au dégel, souvent plus coûteux en temps et ressources.

3.1 Analyses et prédictions effectuées *in silico*

Dans le but de valider la version complète de la protéine TaENO utilisée dans les expériences et permettre des liens avec de l'information disponible dans les banques de données en ligne, des analyses ont été effectuées *in silico* avec les résultats de séquençage obtenus dans le vecteur pTrcHisB (Annexes A et B).

L'alignement des séquences de la protéine émolase, présenté à la figure 3.1, avec les séquences de référence publiées par Sharma (TaENO-a et TaENO-b; Sharma et al., 2013) révèle un pourcentage d'identité élevé : 99,1 % avec TaENO-b (M4Q9V0_WHEAT) et 98,21 % avec TaENO-a (M4QAZ4_WHEAT). Ces résultats confirment la grande similitude de l'émolase TaENO-FL avec les variantes publiées, suggérant fortement que la protéine produite est conforme à la structure de TaENO-b. Néanmoins, une légère divergence observée laisse ouverte la possibilité que la séquence puisse correspondre à une autre isoforme ou variante proche, sans exclure totalement TaENO-a.

```

1                                                                                               82
TaENO-FL      MAATIQSVEARQIFDSRGNPTVEVDVCCSDGTFARAAVPSGASTGVYEALELRDGGSDYLGKGVSKAVNNVNSIIAPALVVK
TaENO-a (... MAATIQSVKARQIFDSRGNPTVEVDVCCSDGTFARAAVPSGASTGVYEALELRDGGSDYLGKGVSKAVDNNVNSIIAPALVVK
TaENO-b (... MAATIQSVKARQIFDSRGNPTVEVDVCCSDGTFARAAVPSGASTGVYEALELRDGGSDYLGKGVSKAVNNVNSIIAPALVVK
.....

83                                                                                               164
TaENO-FL      DPTAQTELDNFMVRQLDGTKNEWGWCKQKLGANAILAVSLAVCKAGASVKKIPLYQHIANLAGNKQLVLPVPFNFVINGGSH
TaENO-a (... DPTAQTELDNFMVQQLDGTKNEWGWCKQKLGANAILAVSLAVCKAGASVKKIPLYQHIANLAGNKQLVLPVPFNFVINGGSH
TaENO-b (... DPTAQTELDNFMVQQLDGTKNEWGWCKQKLGANAILAVSLAVCKAGASVKKIPLYQHIANLAGNKQLVLPVPFNFVINGGSH
.....

165                                                                                              246
TaENO-FL      AGNKLAMQEFMILPTGAASFKEAMKMGVEVYHNLKSVIKKKYGQDATNVGDEGGFAPNIQENKEGLELLKTAIEKAGYTGKV
TaENO-a (... AGNKLAMQEFMILPTGAASFKEAMKMGVEVYHNLKSVIKKKYGQDATNVGDEGGFAPNIRENKEGLELLKTAIEKAGYTGKV
TaENO-b (... AGNKLAMQEFMILPTGAASFKEAMKMGVEVYHNLKSVIKKKYGQDATNVGDEGGFAPNIRENKEGLELLKTAIEKAGYTGKV
.....

247                                                                                              328
TaENO-FL      VIGMDVAASEFYNDKDKTYDLNFKEENNDGSQKISGDSLKNVYKSFVSEYPIVSIEDPFDQDDVWHYAKMTEECGVEVQIVG
TaENO-a (... VIGMDVAASEFYNDKDKTYDLNFKEENNDGSQKISGDSLKNVYKSFVSEYPIVSIEDPFDQDDVWHYAKMTEECGVEVQIVG
TaENO-b (... VIGMDVAASEFYNDKDKTYDLNFKEENNDGSQKISGDSLKNVYKSFVSEYPIVSIEDPFDQDDVWHYAKMTEECGVEVQIVG
.....

329                                                                                              410
TaENO-FL      DLLLVNPNTRVAKAIQEKSCNALLLKVNQIGSVTESIEAVKMSKHAGWGVMTSHRSGETEDTFIADLAVGLSTGQIKTGAPC
TaENO-a (... DLLLVNPNTRVAKAIQEKSCNALLLKVNQIGSVTESIEAVKMSKHAGWGVMTSHRSGETEDTFIADLAVGLSTGQIKTGAPC
TaENO-b (... DLLLVNPNTRVAKAIQEKSCNALLLKVNQIGSVTESIEAVKMSKHAGWGVMTSHRSGETEDTFIADLAVGLSTGQIKTGAPC
.....

411                                                                                              446
TaENO-FL      RSERLAKYNQLLRIEEELGDAAVYAGLKFRAPVEPY
TaENO-a (... RSERLAKYNQLLRIEEELGDAAVYAGLKFRAPVEPY
TaENO-b (... RSERLAKYNQLLRIEEELGDAAVYAGLKFRAPVEPY
.....

```

Figure 3.1 : Alignement des séquences de la protéine TaENO-FL avec les séquences des énoïases de blé publiées

La séquence complète de la protéine TaENO en acides aminés a été déterminée à partir de la séquence d'ADN (Annexe B). Les 2 autres séquences utilisées pour l'alignement sont celles publiées en 2013 (Sharma *et al.*, 2013) avec les accessions UniProt suivantes : TaENO-a (M4QAZ4_WHEAT) et TaENO-b (M4Q9V0_WHEAT). Les différences dans les séquences en acides aminés sont surlignées en rouge. L'alignement des séquences a été réalisé sur la plateforme Benchling en utilisant la méthode Clustal Omega standard (Sievers et Higgins, 2018).

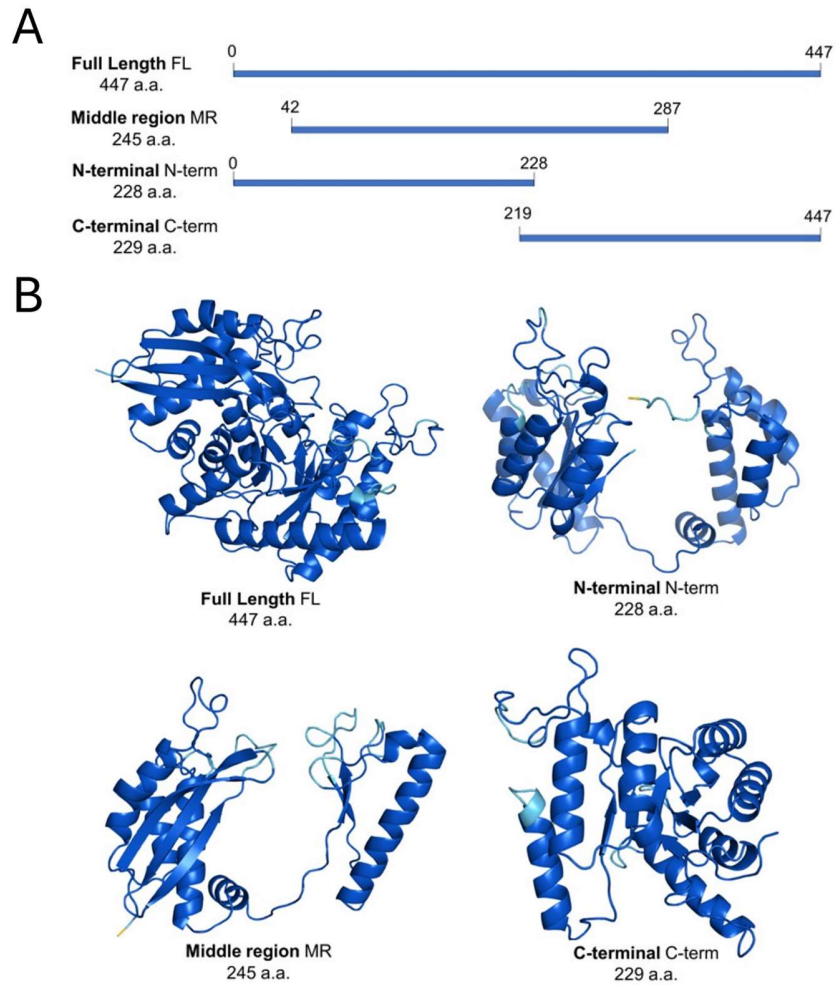


Figure 3.2 : Schématisation et prédiction des structures de TaENO-FL et des fragments générés

A. La taille (a.a. : acides aminés) ainsi que la position relative des fragments par rapport à la protéine complète sont indiquées. B. Les séquences des fragments ont été générées *in silico* et analysées à l'aide du logiciel AlphaFold de DeepMind. La confiance du modèle est la suivante : bleu foncé, très élevée (pLDDT > 90) ; bleu, Confiant (90 > pLDDT > 70) ; jaune, faible (70 > pLDDT > 50) ; orange, très faible (pLDDT < 50).

Les prédictions de structure générées par AlphaFold pour l'énoïase TaENO-FL produite ont permis d'obtenir des modèles tridimensionnels détaillés, offrant une visualisation claire de la conformation attendue pour les protéines. Ces modèles structuraux fournissent une base solide pour comprendre les caractéristiques potentielles des protéines exprimées et établir des homologies avec des protéines similaires, telles que TaENO-b (M4Q9V0 WHEAT (UniProt)) (Figure 3.1). En outre, ils permettent de

caractériser les domaines et structures des fragments obtenus et offrent des perspectives pour modéliser leurs interactions avec d'autres molécules ou protéines, bien que cela n'ait pas été exploré ici.

3.2 Validation de l'expression des protéines d'intérêt

Pour valider l'expression des protéines d'intérêt par le système bactérien *E. coli*, des tests d'expression au sein des bactéries dont la synthèse protéique a été induite ont été effectués. Ils visent à vérifier la présence d'une protéine de la taille correspondante dans un lysat bactérien obtenu à partir de cultures dont la production des protéines d'intérêt a été induite par l'ajout d'IPTG. La séparation des protéines du lysat a été effectuée par électrophorèse sur gel d'acrylamide (12%). Un contrôle négatif contenant une culture homologue dont l'expression protéique n'a pas été induite est présent pour chaque souche et permet de mettre en évidence la protéine produite.

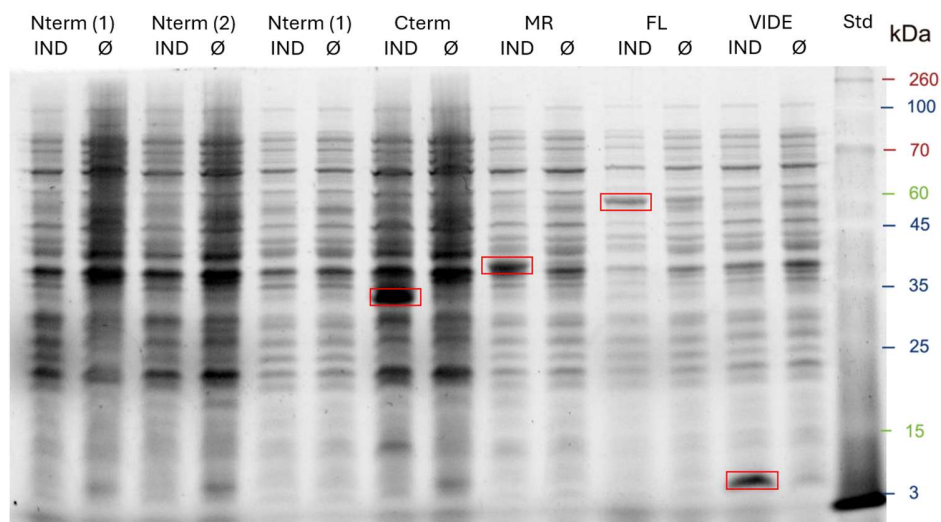


Figure 3.3 : Validation de l'expression des protéines d'intérêt chez les bactéries transformées

Les lysats protéiques des cultures bactériennes ont été séparés sur gel SDS-PAGE 12 %. Chaque paire de pistes représente une culture bactérienne exprimant une version de TaENO (indiquée en haut de la figure), avec ou sans induction par IPTG (respectivement noté IND et Ø). Les cadres rouges mettent en évidence les bandes correspondant aux protéines d'intérêt observées après induction. Un marqueur de poids moléculaire (Std, IRIS11 Prestained Protein Ladder - FroggaBio) est inclus à droite pour estimer la taille des protéines.

Le résultat obtenu permet de mettre en évidence la production de la protéine TaENO.FL d'environ 52 kDa ainsi que les fragments TaENO.MR d'environ 38 kDa et TaENO.C-term d'environ 28 kDa. Un contrôle effectué avec le vecteur pTrcHisB sans insert (VIDE) valide l'expression du tag 6X-His. L'expression dans les

bactéries transformées avec le vecteur contenant l'insert codant pour le fragment N-terminal de la protéine n'a pas pu être validée malgré plusieurs tentatives dans aucun des clones utilisés. Les poids (en kDa) de chaque protéine sont prédits en utilisant la plateforme Benchling (données présentées dans l'annexe D). Les protéines TaBAS1, WCS120 et TaIRI-2 utilisées pour les tests ont été obtenues préalablement par d'autres membres du laboratoire et ont subi des vérifications similaires.

3.3 Tests de cryoconservation chez *E. coli* sur milieu solide

Les premiers tests de cryoconservation ont été réalisés auprès du modèle bactérien *E. coli* et étaient basés sur les ratios du nombre de colonies obtenues après étalement sur gélose de bactéries dégelées, comparées à un contrôle non-gelé. Ces tests répondent à l'hypothèse d'une activité cryoprotectrice acquise chez les bactéries dans lesquelles la production de protéine d'intérêt est induite de manière endogène grâce à l'ajout d'IPTG. L'utilisation du système de production bactérienne pour une expression endogène des protéines, plutôt qu'un ajout exogène, se justifie par la facilité de mise en place de ce modèle, sa rapidité pour obtenir des résultats et des données préliminaires indiquant une possible pénétration des protéines d'intérêt dans les cellules testées (Chow-shi-yée *et al.*, 2016). Les tests ont été réalisés avec la protéine TaENO ainsi que les fragments obtenus à partir de son ADNc, visant à observer des différences potentielles dans les taux de survie obtenus pour les différents fragments dans le but de déterminer le domaine cryoactif de la protéine TaENO.

Les pourcentages de survie obtenus pour les cultures dégelées varient entre 10 et 90%. Une survie maximale était attendue pour les cultures cryoconservées avec 10% de glycérol, souvent établie comme la concentration optimale pour la cryoconservation de *E. coli*. Cette tendance n'est observée que dans certains résultats et s'accompagne d'une grande variabilité entre les répliqués d'expérience.

Parmi les cultures dégelées, les cultures produisant le fragment C-term de la protéine TaENO et les cultures produisant le fragment MR ont obtenu une augmentation significative de la survie lors de l'induction de la production de protéine endogène à 10 et 15% pour TaENO C-term et 10% de glycérol pour TaENO MR par rapport à leur homologue non-induit. Aucun effet significatif n'a pu être observé en lien avec l'induction de la production de protéine dans les autres tests. Une augmentation de la survie en corrélation avec l'augmentation de la concentration de glycérol était attendue mais n'a pas pu être observée dans les tests effectués. Par ailleurs, les manipulations prévues incluaient l'exploration d'un ajout exogène des protéines pour compléter ces tests, mais n'ont pas été réalisés dû à l'absence de certains résultats attendus,

combinée à des difficultés de reproductibilité. Le travail exploratoire a plutôt été redirigé vers des tests permettant un contrôle accru de certaines variables, comme l'homogénéité des densités des cultures bactériennes destinées à la cryoconservation.

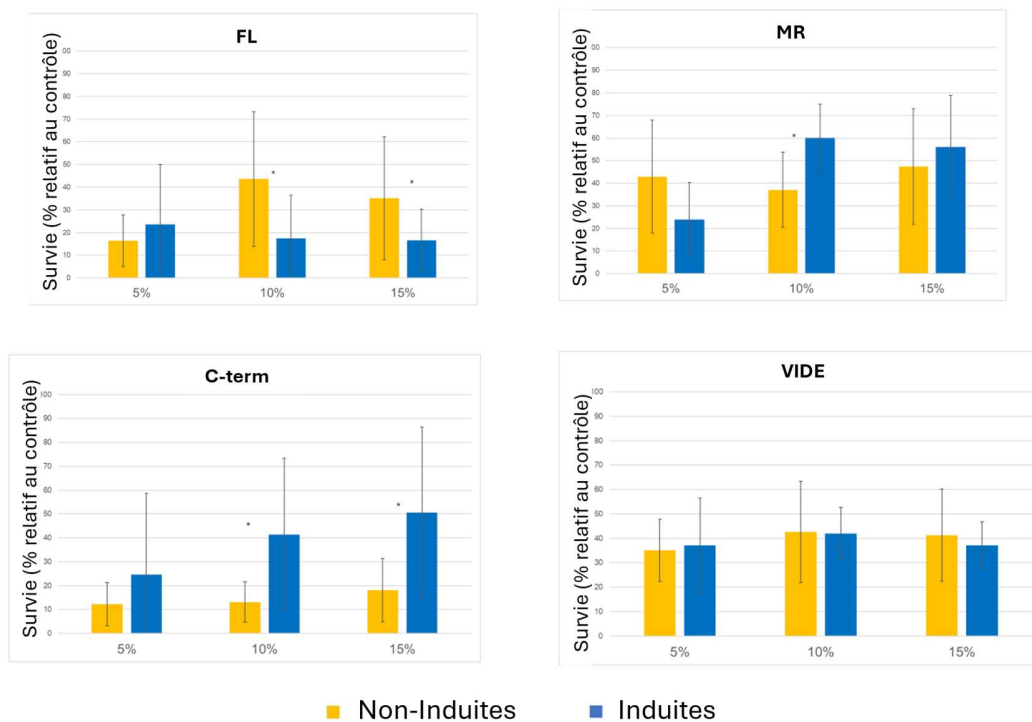


Figure 3.4 : Taux de survie des bactéries *E. coli* après cryoconservation

La survie est exprimée en pourcentage, calculée comme le ratio du nombre de colonies obtenues à partir des cultures décongelées par rapport au contrôle non congelé. Les groupes "Non-Induites" (sans induction IPTG) et "Induites" (avec induction IPTG) sont comparés pour chaque condition de cryoconservation. Les concentrations de glycérol utilisées (5 %, 10 %, et 15 %) sont indiquées sous les barres. Les différences significatives entre les groupes sont signalées par un astérisque (*), selon un test de Student non-pairé (unpaired t-test, $\alpha = 0,05$). Les barres d'erreur représentent l'écart-type des données.

3.4 Tests de cryoconservation chez *E. coli* par cytométrie en flux

Les tests de cryoconservation suivants auprès de *E. coli* ont été réalisés par cytométrie en flux permettant plus de contrôle sur la densité des cultures avant et après le gel/dégel grâce à l'utilisation des microsphères et de la sonde fournies avec la trousse permettant le comptage des cellules. Les tests réalisés ont tenté de répondre à la même hypothèse que celle abordée lors des cryoessais réalisés sur milieu solide, à savoir : l'hypothèse d'une activité cryoprotectrice endogène acquise chez les bactéries ayant produit les protéines

d'intérêt. L'utilisation du PI en plus des réactifs fournis avec le kit de comptage visait à estimer la mort cellulaire quantifiable par l'augmentation du signal positif pour cette sonde. La valeur de signal considérée positive au PI est fixée à l'aide du contrôle de viabilité effectué auprès de chaque culture avant congélation et sert ainsi de référence de viabilité.

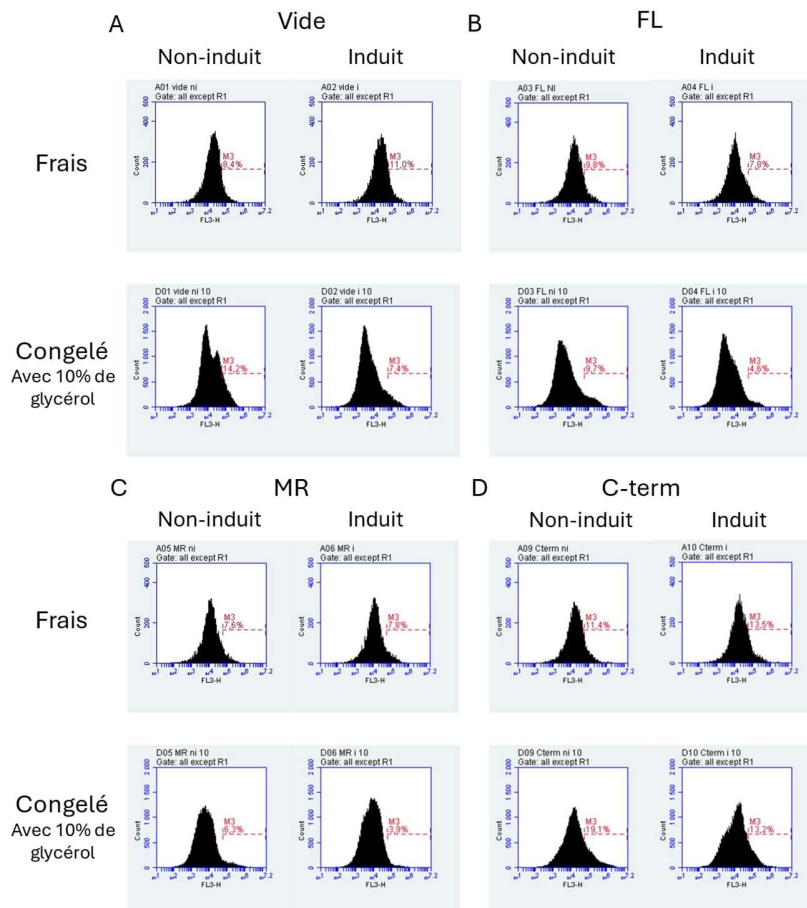


Figure 3.5 : Signal PI des cultures d'*E. coli* produisant les protéines TaENO dans les cryoessais

Analyse de cytométrie en flux montrant les signaux de PI des cultures d'*E. coli* obtenus après excitation à ≈ 490 nm. L'intervalle « M3 » correspond à l'intensité du signal considérée comme négatif pour le PI. (A) Bactéries sans insert (VIDE), (B) avec TaENO FL, (C) avec TaENO MR, et (D) avec TaENO C-term. Pour chaque section (A–D), les histogrammes supérieurs représentent les cultures non-gelées (induites et non induites), tandis que les histogrammes inférieurs montrent les cultures cryoconservées avec 10 % de glycérol. Les signaux des microsphères utilisées pour le comptage (Gate : "all except R1") ont été exclus. Les tests réalisés avec d'autres concentrations de glycérol (0, 5 et 15 %) ne sont pas inclus pour plus de clarté.

Les résultats obtenus ne présentent pas de pics d'intensités différentes du signal PI renvoyé qui aurait permis la distinction des populations vivantes de populations bactériennes mortes. Pour une grande partie des tests effectués, les bactéries congelées renvoient un signal moins fort pour le PI par rapport à leur homologue frais. La proportion de signal dont l'intensité se trouve dans l'intervalle M3 défini varie entre 3.9% et 35.2% pour les cultures dégelées avec une moyenne de 13.45%, alors que cette moyenne est de ≈ 10.01 chez les contrôles frais. La différence entre les deux moyennes est inférieure à celle attendue, en effet un plus fort signal était attendu auprès des bactéries dégelées à la suite des dommages provoqués par la congélation/décongélation. De plus, les résultats obtenus ne semblent pas dépendre de la concentration du glycérol ou de l'induction des protéines d'intérêt. Le protocole utilisé visait à explorer rapidement le potentiel cryoprotecteur endogène des protéines testées. Bien qu'une congélation prolongée à -80 °C ait pu éventuellement accentuer certains effets liés aux dommages cellulaires, cela sortait de l'objectif initial, qui était de tester un modèle à court terme pour simplifier et accélérer les comparaisons. Malgré des tentatives d'adaptation du protocole présenté, les résultats obtenus auprès du modèle *E. coli* n'ont pas permis l'obtention de résultats fiables permettant d'estimer le potentiel cryoprotecteur endogène des protéines testées.

3.5 Tests de cryoconservation avec les cellules HeLa

Les tests effectués sur les cellules eucaryotes HeLa ont été réalisés par cytométrie en flux en utilisant les sondes Calcéine-AM et PI, permettant de distinguer les populations cellulaires viables et non viables avant et après congélation. L'effet cryoprotecteur des protéines recombinantes TaENO.FL et TaENO.C-term a été évalué après leur ajout au milieu de congélation. Les résultats obtenus ont été comparés à plusieurs contrôles : un contrôle négatif sans cryoprotecteur, un contrôle positif contenant du DMSO, cryoprotecteur de référence pour les cellules HeLa, et un contrôle évaluant l'effet d'une protéine non-cryoprotectrice (BSA) ajoutée à une concentration équivalente à celle des protéines testées.

Une intensité de signal représentée par l'intervalle M4 sur la figure définit le signal renvoyé par les cellules considérées mortes. Les résultats obtenus montrent une hausse de signaux de forte intensité pour les cellules cryoconservées en l'absence de CPAs (53.6%) par rapport au contrôle (2.7%). Les cellules cryoconservées en présence de TaENO.FL ont obtenu un pourcentage de signaux associés à des cellules mortes inférieur (8.2%) à celui des cellules cryoconservées en présence de BSA (28%) ainsi qu'au contrôle négatif (53.6%) indiquant un effet positif potentiel sur l'augmentation de la survie. Les cellules

cryoconservées en présence de 15% de DMSO ont obtenu une survie supérieure avec un signal positif au PI de 6.6%.

Les effets positifs apparents sur la survie des cellules HeLa ont motivé des essais auprès du modèle en utilisant un fragment de la protéine TaENO.FL, à savoir TaENO.C-term dont de potentiels effets cryoprotecteurs avaient été mis de l'avant lors des tests auprès du modèle procaryote *E. coli*.

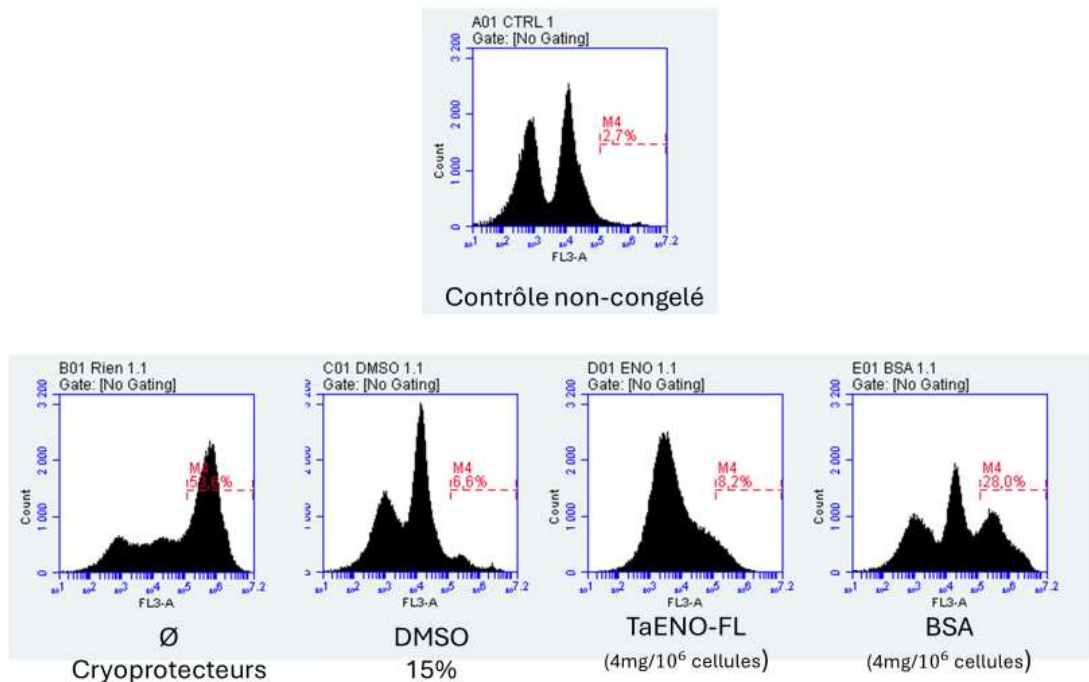


Figure 3.6 : Signal PI observé chez les cellules HeLa lors des cryoessais avec TaENO.FL

Les résultats présentés dans la figure consistent en l'analyse du signal renvoyé par le PI lors du passage des cellules devant le capteur après excitation à la longueur d'onde adaptée (≈ 490 nm.) L'intervalle « M4 » désigne la valeur d'intensité du signal en dessous de laquelle le signal est considéré négatif pour le PI. La partie supérieure de la figure montre les résultats obtenus pour le contrôle de viabilité effectué auprès des cellules fraîches avant leur cryoconservation. La partie inférieure de la figure montre le résultat obtenu pour un des réplicas techniques de cryoessais effectués de chaque condition (n=8).

Les résultats obtenus pour les conditions réitérées suivent les tendances observées dans la figure 3.4 et confirment les observations effectuées pour les 4 conditions reproduites (\emptyset cryoprotecteurs, DMSO 15%, BSA (4mg/10⁶cellules) et TaENO (4mg/10⁶cellules)). Une diminution du signal positif pour le PI est observable dans cette figure chez les cellules cryoconservées avec le fragment C-terminal de la protéine TaENO par rapport aux tests effectués avec la version complète de la protéine en concentration

équivalente. L'ensemble des données relatives au signal positif au PI pour l'ensemble des répliques effectués est compilé dans la figure suivante. Les tests réalisés ont mis de l'avant un effet cryoprotecteur potentiellement plus important pour le fragment C-terminal de TaENO en comparaison à la version complète de la protéine en quantités équivalentes, mettant de l'avant ce fragment comme pouvant être responsable de l'activité cryoprotectrice de TaENO. Les tests effectués en présence du fragment C-terminal de TaENO mènent aussi à des taux de survie proches de ceux obtenus avec une concentration de 10% DMSO dans le milieu de congélation de cellules HeLa mettant de l'avant son efficacité comme potentiel CPA.

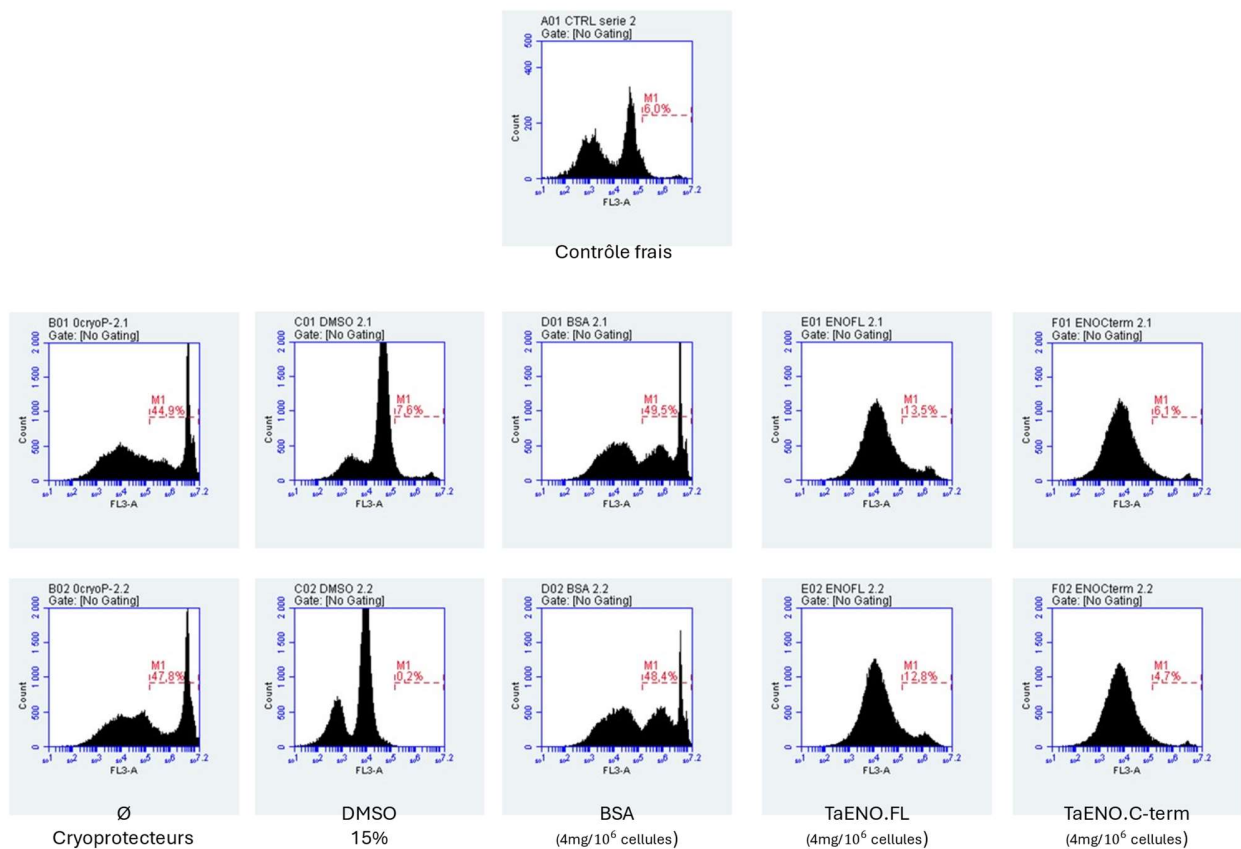


Figure 3.7 : Signal PI observé chez les cellules HeLa lors des cryoessais avec TaENO.FL et TaENO.C-term

Les résultats présentés dans la figure consistent en l'analyse du signal renvoyé par le PI lors du passage des cellules devant le capteur après excitation à la longueur d'onde adaptée (≈ 490 nm.) L'intervalle « M1 » désigne la valeur d'intensité du signal en dessous de laquelle le signal est considéré « négatif » pour le PI. La partie supérieure de la figure montre les résultats obtenus pour le contrôle de viabilité effectué auprès des cellules fraîches avant leur cryoconservation. La partie inférieure de la figure montre les résultats obtenus pour deux des répliques techniques de cryoessais effectués de chaque condition (n=5).

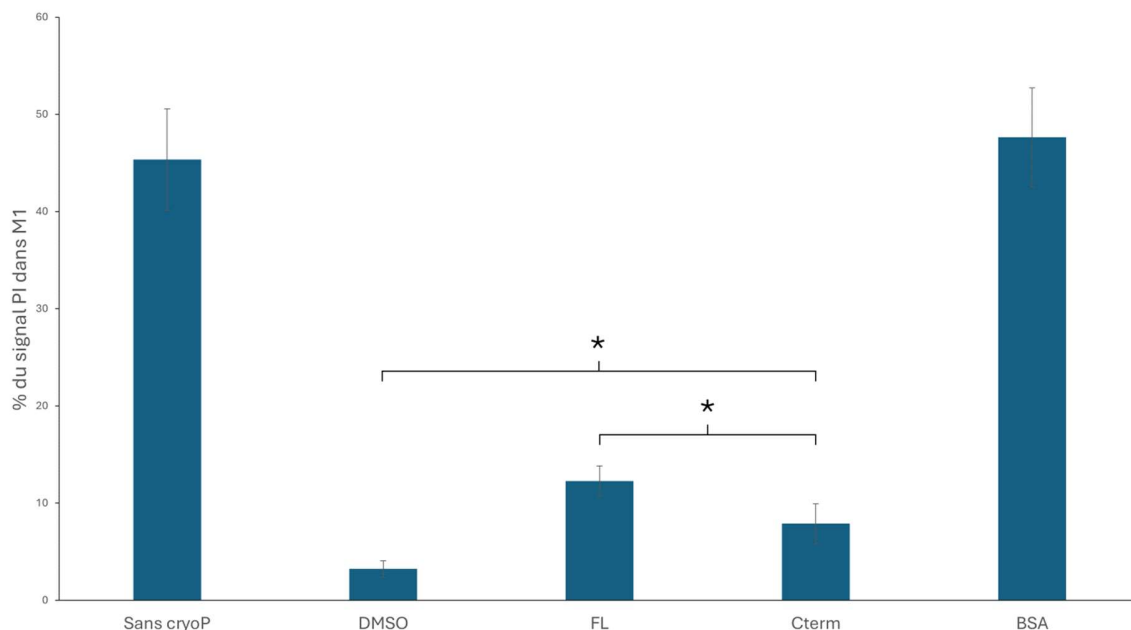


Figure 3.8 : Taux de mortalité des cellules HeLa obtenus en présence des CPAs testés

Les moyennes affichées représentent les pourcentages de signaux PI compris dans l'intervalle M1 (Figure 3.5) obtenus pour chaque condition testée dans les cryoessais réalisés auprès des cellules HeLa. Les barres d'erreur renseignent l'écart moyen obtenu pour chaque série de données. « Sans cryoP » : tests réalisés en l'absence de cryoprotecteurs, « DMSO » : test réalisés en présence de 10% de DMSO, « FL » : tests réalisés en présence de TaENO (4mg/10⁶cellules), « Cterm » : tests réalisés en présence de TaENO C-term (4mg/10⁶cellules), BSA : tests réalisés en présence de BSA (4mg/10⁶cellules). Le test statistique de Student a été utilisé, et les différences significatives obtenues sont indiquées par un astérisque ($\alpha = 0,05$)

3.6 Essais auprès des organoïdes

La version complète de la protéine TaENO (TaENO.FL) ainsi que TaBAS1, WCS120 et TaIRI-2 ont été utilisées pour les tests auprès des organoïdes. Ces protéines ont été préalablement évaluées pour leur activité cryoprotectrice auprès de certains types cellulaires (hépatocytes de rat/INS832/13) (Averill-Bates *et al.*, 2016; Grondin *et al.*, 2009; Grondin *et al.*, 2013). Les tests effectués visent à évaluer le potentiel de ces protéines comme CPA de structures cellulaires complexes comme les organoïdes et établir une méthode efficace de cryoconservation pour ce modèle. Les résultats présentés ont été obtenus auprès d'organoïdes ayant subi une étape de manipulations supplémentaire nécessaire pour l'observation du centre de leur structure. Ces étapes consistent en la transparisation chimique de l'organoïde ou sa découpe histologique décrites précédemment. En l'absence de ces traitements la diffusion des lasers utilisés pour l'excitation des sondes menait à une absence de signal dans les tissus plus profonds des organoïdes entiers.

3.6.1 Tests de diffusion des protéines

Parmi les premiers tests à effectuer auprès d'un modèle cellulaire complexe se trouvent les tests permettant de juger de la perméabilité des cryoprotecteurs au sein de sa structure. Les protéines d'intérêt ont pour ce faire été marquées avec une sonde fluorescente permettant de suivre leur progression dans la structure et d'ainsi caractériser leur diffusion à différents intervalles de temps.

Les tests ont été réalisés avec des périodes de diffusion allant de 30 min jusqu'à 6 heures auprès des organoïdes de cerveau permettant l'observation de la progression des protéines marquées dans une structure de grande taille (>300 μm). Les tests réalisés pour les organoïdes de pancréas ont été effectués avec une diffusion d'une heure seulement en raison du nombre limité d'échantillons et les données obtenues au préalable avec les organoïdes de cerveau. Les organoïdes utilisés pour ces tests sont des organoïdes matures entretenus deux jours après livraison pour acclimatation en plaque de culture avec le milieu adapté en suivant les besoins de culture décrits avant mise en contact avec les protéines.

3.6.1.1 Organoïdes de cerveau

Les organoïdes de cerveau utilisés dans ces tests étaient des structures volumineuses (>300 μm), permettant une observation détaillée de la diffusion des protéines marquées. Les expériences ont été menées sur des périodes variant de 30 minutes à 6 heures, afin de suivre leur progression dans les différentes couches des organoïdes. Avant leur exposition aux protéines, ces modèles ont été maintenus en culture pendant deux jours après réception, dans un milieu spécifique fourni par le laboratoire de Tom Durcan, pour garantir leur maturité et leur viabilité. Ces conditions expérimentales ont permis de recueillir des données sur la cinétique de diffusion dans des structures cellulaires complexes de grande taille.

Toutes les protéines d'intérêt semblent avoir pu diffuser jusqu'au centre des organoïdes de cerveau et ce dès 1 heure d'exposition (résultats non-présentés). L'exposition pendant de plus longues durées a été testée sans produire de différence observable. Certaines protéines comme TaIRI-2, WCS120 et moindrement TaBAS semblent être concentrées en certains points dans l'organoïde. TaENO et de manière moins forte, TaBAS, montrent un signal diffus sur l'ensemble d'une partie de la coupe. Des photos prises avec un grossissement plus important n'ont pas permis de mettre de l'avant une localisation précise des protéines au sein des cellules.

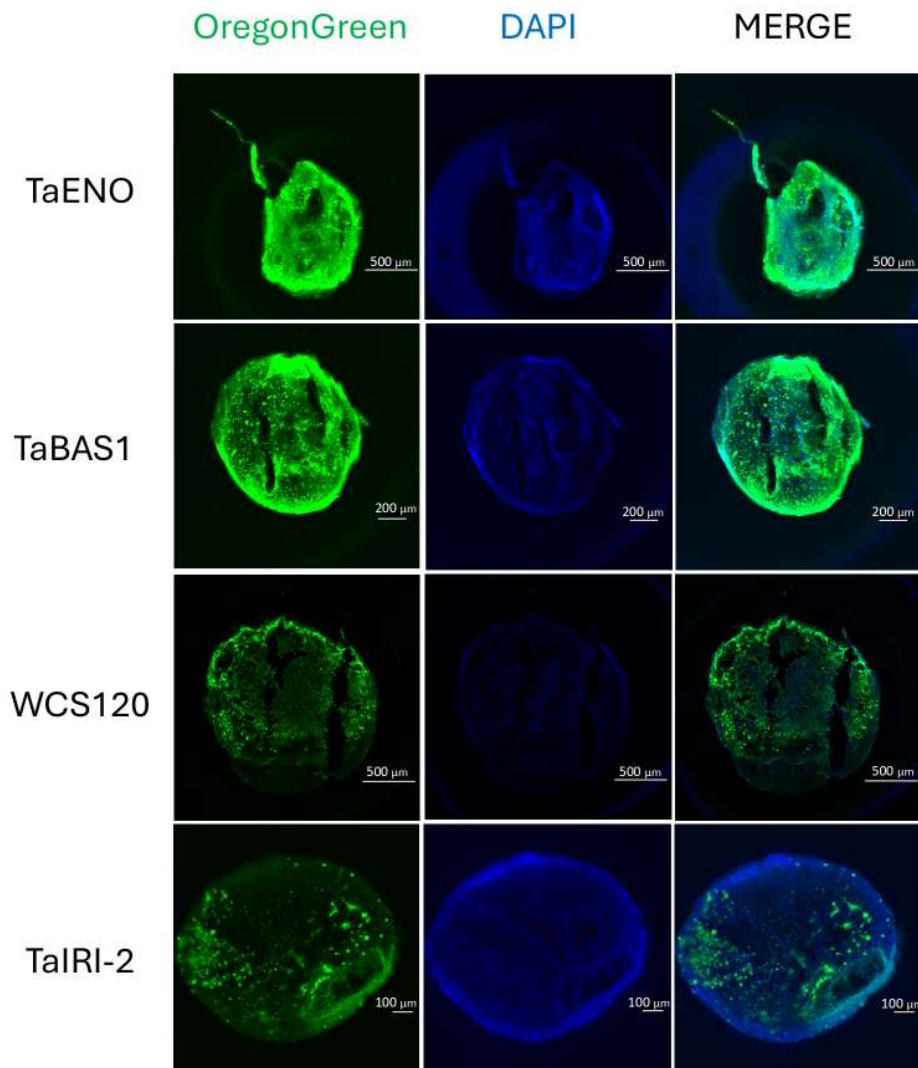


Figure 3.9 : Diffusion des protéines dans les organoïdes de cerveau

Les photos ont été obtenues par observation au microscope confocal à fluorescence (Objectif 10X à air) sur des coupes histologiques (~100 μm) d'organoïdes de cerveau préalablement mis en contact avec les protéines d'intérêt marquées avec la sonde fluorescente OregonGreen pendant 2h puis fixés. Le DAPI a été appliqué aux coupes puis lavé pour mise en évidence de la structure observée. Les images ont été traitées à l'aide du logiciel NisElementViewer. L'échelle est indiquée dans le coin droite en bas de chaque image.

3.6.1.2 Organoïdes de pancréas

Les organoïdes de pancréas, en raison de contraintes expérimentales, ont été étudiés sur une période d'une heure seulement pour la diffusion des protéines recombinantes. Ce choix a été motivé par le nombre limité d'échantillons disponibles et par les informations obtenues lors des tests précédents avec les

organoïdes de cerveau. Bien qu'ils diffèrent en taille et en structure, ces organoïdes ont suivi un protocole d'acclimatation similaire, avec deux jours en culture avant l'exposition aux protéines marquées. Ces conditions ont permis de générer des données comparables sur la cinétique de diffusion dans des structures cellulaires plus petites.

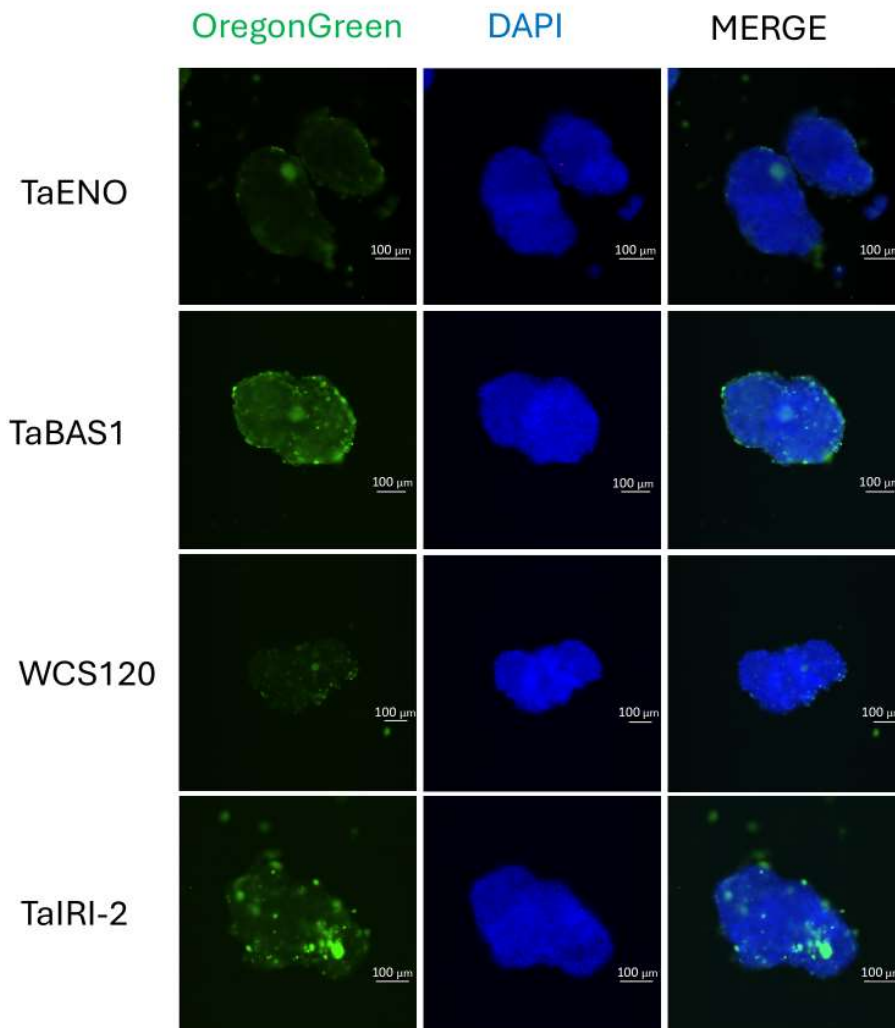


Figure 3.10 : Diffusion des protéines dans les organoïdes de pancréas

Les photos ont été obtenues par observation au microscope confocal à fluorescence (Objectif 10X à air) sur des organoïdes de pancréas entiers préalablement mis en contact avec les protéines d'intérêt marquées avec la sonde fluorescente OregonGreen puis fixés en vue de leur clarification. Les organoïdes ont été clarifiés en utilisant un protocole standard de transparence CUBIC (CUBIC Tissue Clearing Protocol). Le DAPI est appliqué aux organoïdes puis lavé pour mise en évidence de la structure observée. Les images ont été traitées à l'aide du logiciel NisElementViewer. L'échelle est indiquée dans le coin droit en bas de chaque image.

Les photographies représentent le plan focal correspondant au centre d'organoïdes de pancréas clarifiés. Une meilleure diffusion est observée pour les protéines TaIRI-2 et TaBAS que pour les protéines TaENO et WCS120 pour lesquelles un signal diffus est tout de même observé sur l'ensemble de la structure de l'organoïde. Il est noté que les protéines TaBAS et TaIRI-2 obtiennent un signal fort à certains emplacements précis, signe d'une potentielle accumulation des protéines au sein de certaines structures de l'organoïde. Seule la diffusion des protéines pendant une heure a été testée auprès des organoïdes de pancréas.

Les expériences de diffusion menées sur les deux types d'organoïdes ont montré que les protéines marquées diffusent rapidement au sein des structures dès 30 minutes d'exposition (bien que ces résultats ne soient pas présentés ici). Après une heure de diffusion, la distribution des protéines a été observée jusqu'au centre de la structure pour tous les types de protéines et les deux modèles d'organoïdes. Toutefois, il n'a pas été possible de déterminer précisément la localisation des protéines (intracellulaire/extracellulaire, organites/membranes, etc.) avec les méthodes employées. De plus, aucune corrélation significative entre la concentration de la protéine d'intérêt et la diffusion observée n'a pu être établie.

3.6.2 Tests de viabilité

Après avoir caractérisé la diffusion des protéines d'intérêt au sein des organoïdes, l'étape suivante consistait à évaluer leur impact sur la viabilité cellulaire après cryoconservation. Ces tests s'appuient sur les informations obtenues lors des analyses de diffusion, permettant d'adapter les conditions expérimentales, notamment les durées d'exposition et les quantités de protéines, afin d'optimiser leur interaction avec les structures étudiées. L'objectif principal est d'analyser si ces protéines, utilisées comme cryoprotectants potentiels, contribuent à préserver l'intégrité et la viabilité des cellules dans des structures multicellulaires complexes.

3.6.2.1 Organoïdes de cerveau

Les organoïdes de cerveau, en raison de leur taille importante (>300 μm) et de leur densité cellulaire, constituent un modèle particulièrement adapté pour évaluer l'effet des protéines cryoprotectantes dans un environnement multicellulaire complexe. Ces expériences offrent également une opportunité d'examiner la capacité des cryoprotectants à préserver l'intégrité de la structure interne des organoïdes après dégel, un facteur clé pour garantir la fiabilité et la représentativité des analyses effectuées.

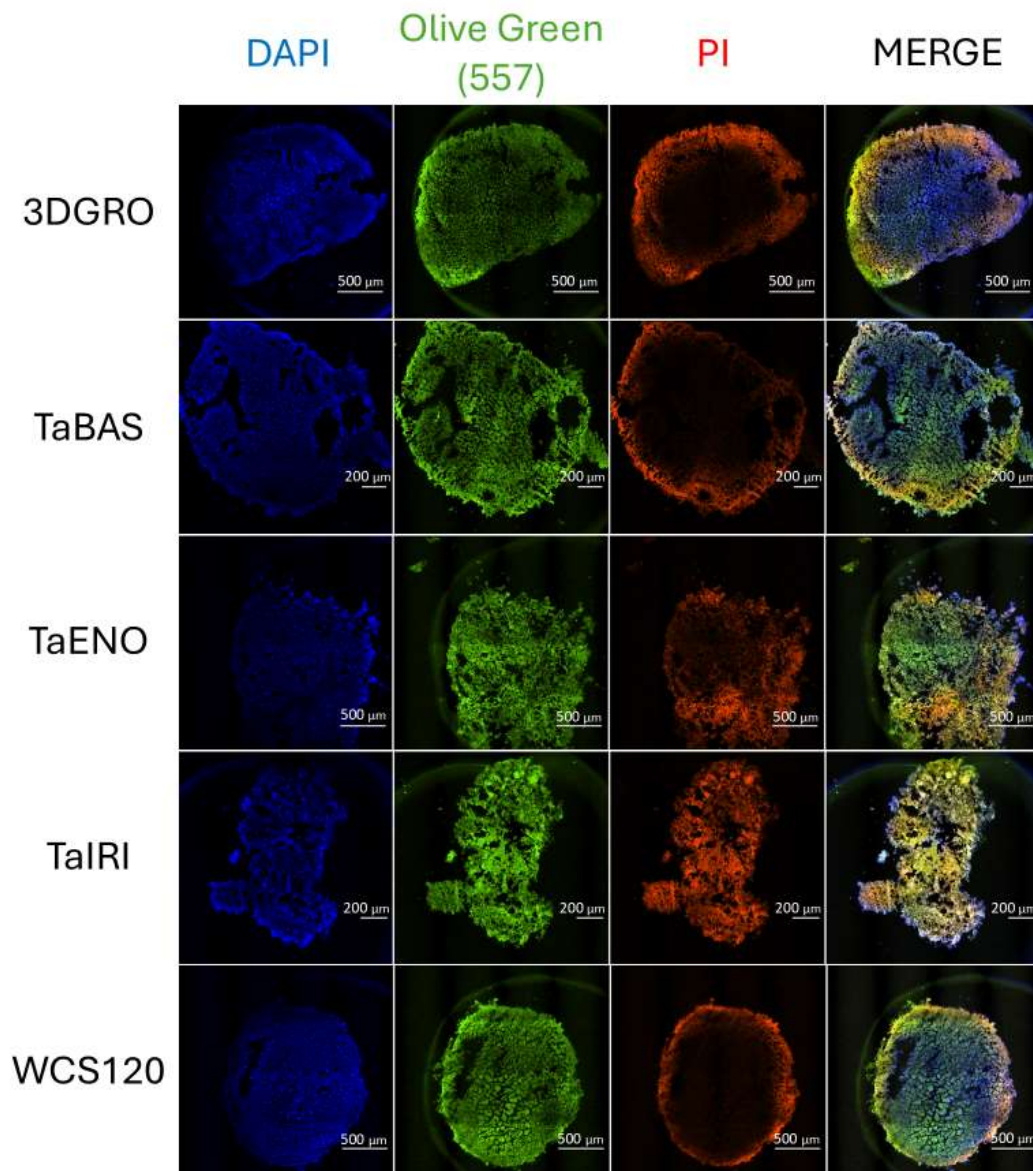


Figure 3.11 : Viabilité d'organoïdes cérébraux après congélation en présence des protéines d'intérêt

Les photos ont été obtenues par observation au microscope confocal à fluorescence (objectif 10X à air) sur des coupes histologiques d'organoïdes de cerveau marqués avec deux sondes permettant d'estimer la viabilité cellulaire (OliveGreen557/PI) puis fixées en vue de leur coupe (~100µm) avec un microtome à cryostat. Les images présentent des coupes effectuées vers le centre de la structure afin d'obtenir un signal représentatif de l'ensemble de la structure. Le DAPI a été appliqué aux coupes puis lavé pour mise en évidence de la structure observée. Les images ont été traitées à l'aide du logiciel NisElementViewer. L'échelle est indiquée dans le coin droit en bas de chaque image.

La figure 3.11 présente les signaux obtenus pour les tests de viabilité effectués après le dégel des organoïdes. Les organoïdes mis en contact avec les sondes fluorescentes (OliveGreen 577/PI) ont été fixés

en utilisant une solution de PFA en vue de leur coupe. Les photographies montrent des coupes d'organoïdes dont la structure a été préservée après décongélation, permettant l'observation complète d'une tranche circulaire à travers la sphère entière. En l'absence d'une structure permettant la manipulation de l'échantillon, une observation qualitative de la structure et des signaux obtenus a été effectuée (résultats non-présentés) mais ne permet généralement pas l'estimation de la viabilité générale de l'organoïde. L'observation de l'intensité du signal renvoyée par les deux sondes de viabilité utilisées (OliveGreen 577/PI) permet l'évaluation de la viabilité des cellules marquées observées.

La diminution du signal positif pour le PI observée au centre des coupes d'organoïdes pourrait suggérer une meilleure survie cellulaire dans cette région. Pour WCS120, TaBAS, et 3DGRO, aucune fluorescence PI n'est visible au centre, tandis qu'une intensité est notable en périphérie. Pour TaENO, un faible signal persiste au centre, devenant progressivement plus intense vers les bords. Un schéma similaire, bien que moins distinct, est observable avec le marquage à l'OliveGreen, où les variations restent peu prononcées, notamment pour TaENO, ce qui pourrait refléter une limite dans la capacité des sondes utilisées à différencier précisément les populations viables. Enfin, les organoïdes cryoconservés avec TaIRI-2 présentent un signal élevé pour les deux sondes sur toute la structure, traduisant un taux élevé de mortalité cellulaire généralisée. Ces résultats mettent en évidence des différences dans les profils de viabilité cellulaire entre les protéines testées, tout en soulignant la nécessité d'approches complémentaires pour une interprétation précise des signaux fluorescents dans les structures des organoïdes.

Les expériences réalisées avec des quantités supérieures de protéines par organoïde de cerveau n'ont pas amélioré la viabilité des structures testées. De plus, une perte d'intégrité structurelle a été observée après décongélation, en particulier lorsque des quantités élevées (≥ 1 mg par organoïde) ou des mélanges de protéines d'intérêt ont été utilisés (Annexe G). Cette désorganisation a rendu difficile la reconstitution des caractéristiques structurales des organoïdes, empêchant ainsi une localisation claire du centre ou de la périphérie avant l'acquisition des images au microscope. Ces limitations ont compromis l'interprétation des résultats de viabilité dans les conditions testées.

3.6.2.2 Organoïdes de pancréas

Les organoïdes de pancréas, en raison de leur plus petite taille et de leur architecture différente, offrent un modèle distinct mais complémentaire pour évaluer l'impact des protéines cryoprotectantes. Bien que plus petits et plus difficiles à manipuler que les organoïdes de cerveau, ces organoïdes permettent d'explorer l'efficacité des cryoprotectants dans des structures moins volumineuses, tout en permettant de tester leur capacité à maintenir la viabilité cellulaire et l'intégrité des organoïdes après congélation et dégel.

Les cryoessais effectués auprès des organoïdes de pancréas (Figures 3.12) n'ont pas permis de mettre de l'avant un potentiel effet cryoprotecteur des protéines d'intérêt et les essais réalisés avec le produit de cryoconservation commercial 3dGRO ont obtenu des résultats similaires. La difficulté d'entretien et de manipulation de ce modèle ont amené des complications dans la réalisation des expériences planifiées. Les organoïdes pancréatiques ont tendance à s'agglomérer et perdre leur structure lors de leur entretien en culture et des suites du dégel, rendant leur observation par les techniques utilisées difficile. Parmi les conditions ayant permis de réaliser les tests de viabilité après décongélation, les organoïdes imagés ont montré un signal suggérant une mort cellulaire généralisée à travers toute la structure (données non-montrées).

3.6.3 Test CAS-3 clivée

Les coupes d'organoïdes de cerveau dont la viabilité a été observée ont été soumises à une deuxième expérience de marquage consistant en l'utilisation d'un anticorps ciblant la forme clivée de la Caspase-3 (CAS-3). Cette détection vise à mettre en évidence la présence de forme activée de la CAS-3 qui est corrélée avec l'activation de voies apoptotiques chez les cellules.

Les essais de marquage avec l'anticorps spécifique à la forme clivée de la caspase-3 effectués auprès des coupes histologiques d'organoïdes de cerveau ont permis de mettre de l'avant les zones les plus touchées par la mort apoptotique chez les cellules des organoïdes. Un contrôle a été effectué auprès d'organoïdes non-congelés (Frais, Figure 3.13) pour estimer la viabilité des échantillons au préalable de leur manipulation. Ce contrôle permet d'observer un signal positif dans certaines régions de la structure, montrant une potentielle induction d'apoptose dans ces dernières en lien avec les conditions de culture et/ou l'exposition aux sondes fluorescentes et/ou le processus de fixation par PFA. Les résultats obtenus pour les différentes conditions testées montrent néanmoins un signal généralement plus intense et diffus

sur une plus grande partie de la structure, mettant de l'avant dommages potentiellement provoqués par les processus de gel/dégel. Les tests effectués avec le produit commercial 3DGRO montrent une induction d'apoptose localisée dans une région précise de l'organoïde et un signal diffus dans l'ensemble de la structure, moins fort que celui observé sur les coupes d'organoïdes cryoconservés en présence des protéines d'intérêt. Les résultats pour les tests effectués avec les protéines recombinantes TaENO et WCS120 montrent un signal intense vers les régions extérieures et moins fort pour l'intérieur de la structure. Le signal faible observé pour l'intérieur des structures pourrait être mis en lien avec une atteinte réduite/ralentie par la présence de TaENO et WCS120 des effets du gel sur la survie cellulaire. Le gel étant généralement plus dommageable pour les structures en contact direct avec le milieu de cryoconservation plus propice à la nucléation de cristaux de glace. Pour les tests effectués en présence de TaIRI-2, un signal intense et diffus est observé sur l'ensemble de la structure. Les résultats présentés pour les tests effectués en présence de TaBAS1 semblent mettre de l'avant une perte de densité cellulaire dans la zone périphérique de l'organoïde mise en évidence par la diminution du signal pour le DAPI dans cette zone. Le signal obtenu pour la détection de la CAS-3 demeure proportionnellement fort pour cette zone. Le centre de l'organoïde, bien que semblant avoir maintenu sa densité cellulaire, présente aussi un signal intense pour la CAS-3. Les résultats obtenus pour les tests réalisés en présence de TaBAS1 et TaIRI-2 ne permettent pas de mettre de l'avant un effet de diminution apoptotique auprès des organoïdes de cerveau pour ces deux protéines avec les méthodes mises en place. Les tests réalisés avec TaENO et WCS120 semblent avoir mené à une induction apoptotique diminuée par rapport à ceux réalisés en présence de TaBAS1 et TaIRI-2, potentiellement liée à des effets cryoprotecteurs moins forts que ceux obtenus en présence de la solution commerciale 3dGRO. Il est important de noter que la variabilité initiale de la viabilité des organoïdes avant les tests, caractérisée par des taux de survie parfois inférieurs à 100 % dans certains cas, pourrait avoir influencé les résultats obtenus. Cette situation complique l'évaluation précise des effets des différentes protéines, mais suggère que même des résultats de survie modestes pourraient refléter un effet cryoprotecteur des substances testées, en limitant davantage les dommages induits par la cryoconservation

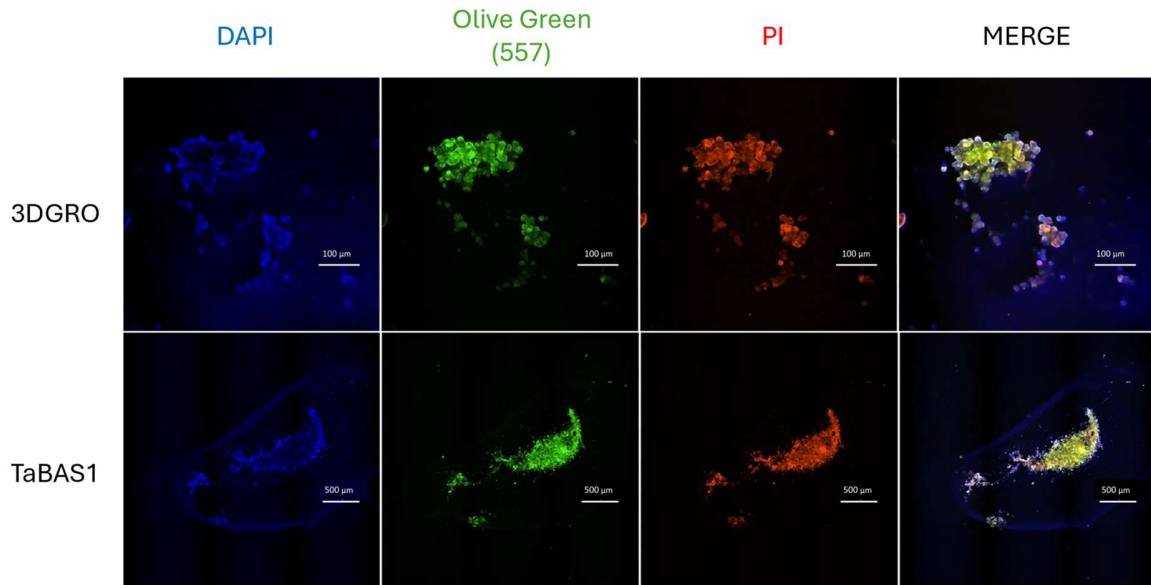


Figure 3.12 : Viabilité d'organoïdes de pancréas après congélation

Les photos ont été obtenues par observation au microscope confocal à fluorescence (Objectif 10X à air) sur des coupes (~100 μm) d'un organoïde de pancréas congelé en présence de de la solution commerciale 3dGRO (en haut) ou 1mg de TaBAS1 (en bas). Après dégel l'organoïde a été marqué avec deux sondes permettant d'estimer la viabilité cellulaire (Calcéine-AM/PI) puis fixé en vue de sa coupe avec un microtome à cryostat. Le DAPI a été appliqué aux organoïdes avant lavage pour permettre la mise en évidence de la structure. Les images ont été traitées à l'aide du logiciel NisElementViewer. L'échelle est indiquée à droite de chaque image.

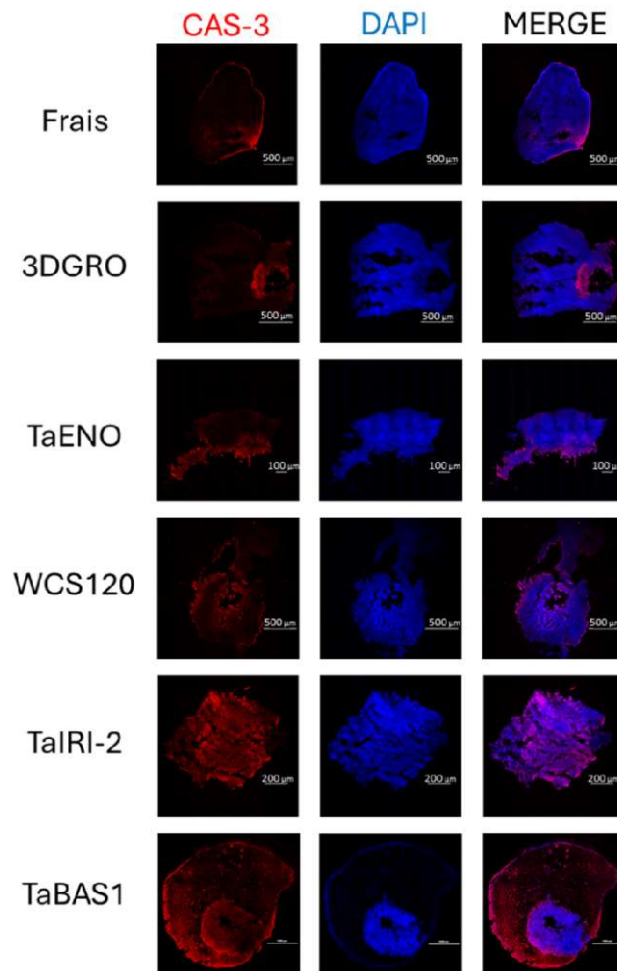


Figure 3.13 : Détection de la caspase-3 clivée par immunofluorescence sur coupes histologiques d'organoïdes de cerveau

Les photos ont été obtenues par observation au microscope confocal à fluorescence (Objectif 10X à air) sur des coupes (~50 µm) d'organoïdes de cerveau marqués pour la détection de la forme clivée de la CAS-3. Les coupes histologiques préalablement marquées pour l'estimation de leur viabilité ont été soumises à un stripping (dénaturation) par Glycine-SDS, puis soumises à un protocole d'immunofluorescence sur coupes histologiques standard utilisant un anticorps spécifique liant la forme clivée de la caspase-3. L'observation a été effectuée avec un microscope confocal à fluorescence (Objectif 10X à air). Les images ont été traitées à l'aide du logiciel NisElementViewer. L'échelle est indiquée à droite de chaque image.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

La cryoconservation est un des seuls moyens d'augmenter le temps alloué à la manipulation et l'utilisation de plusieurs types de matériaux biologiques en permettant leur entreposage à long terme et leur transport. Si les efforts de recherche dans le domaine permettent déjà une grande amélioration des techniques de conservation des matériaux biologiques, certains obtiennent encore une viabilité insuffisante post-dégel en vue de certaines applications. En plus de l'incapacité à cryoconserver certains matériaux sur de longues durées, la cryoconservation est un domaine onéreux en ressources et reposant souvent sur l'usage de composés toxiques pouvant affecter les applications en transplantation notamment. Les techniques de cryoconservation utilisées couramment sont souvent établies par tests réalisés auprès de modèles précis pouvant réagir de manière différente à certaines conditions de cryoconservation. Ces limites encouragent l'effort pour le développement de techniques rapides, peu onéreuses, reposant sur des composés avec une toxicité limitée et dont l'efficacité est estimée auprès de plusieurs modèles. L'étude présente se place dans cet optique en tentant de développer et caractériser la cryoconservation de plusieurs modèles cellulaires en utilisant des protéines d'origine naturelle moins toxiques tout en gardant une méthodologie proche de celle utilisée dans la cryoconservation conventionnelle pour faciliter sa mise en place.

Plusieurs protéines préalablement caractérisées comme potentiels CPAs ont donc été utilisées dont l'énolase TaENO avec laquelle plusieurs fragments ont été générés dans un but d'identification de ses domaines cryoactifs. En plus de TaENO, les protéines TaBAS1, TaIRI-2 et WCS120 ont aussi été utilisées dans les tests. Ces protéines ont montré une activité cryoprotectrice auprès d'hépatocytes de rat et de cellules INS832/13 (Averill-Bates *et al.*, 2016) et représentent une alternative naturelle aux composés toxiques utilisés conventionnellement lors de la cryoconservation. Les tests effectués visent à établir le potentiel de ces protéines en tant que CPAs auprès de différents modèles cellulaires, en se basant sur l'application de méthodes de congélation et dégel similaires à celles utilisées pour leur cryoconservation.

4.1 Développement de cryoessais avec le modèle procaryote *E. coli*

Les premiers tests ont été effectués auprès du modèle bactérien *E. coli* en raison de la disponibilité des souches transformées exprimant les protéines d'intérêt. La culture d'*E. coli* est rapide et facilitée par l'utilisation de vecteurs porteurs de gènes de résistance antibiotique permettant la sélection des bactéries transformées. Si la cryoconservation de souches de *E. coli* est rendue possible par le simple ajout de

glycérol dans le milieu de congélation (Tuttle *et al.*, 2021), son absence affecte négativement la survie des cultures dégelées mettant de l'avant une atteinte de la viabilité de ce modèle par le processus de gel/dégel. C'est basé sur cette atteinte que les tests effectués visent à évaluer les potentiels effets positifs de la production des protéines d'intérêt par la bactérie sur sa survie lors de sa cryoconservation en présence de concentrations variables de glycérol.

Les tests réalisés avec la protéine TaENO et les fragments générés à partir de son ADNc visent à mettre de l'avant de potentiels effets de la présence endogène de ces protéines recombinantes sur la survie cellulaire. La protéine TaENO a montré pouvoir améliorer la survie d'hépatocytes de rat et de cellules INS832/13 cryoconservés en sa présence en comparaison avec des tests similaires effectués en présence de DMSO (Chow-shi-yée *et al.*, 2020; Grondin *et al.*, 2015). Bien qu'un effet bénéfique sur la survie post-dégel ait pu être observé en présence de cette protéine, ses mécanismes d'action et les domaines responsables de son activité n'ont pas encore été caractérisés. Ce manque de caractérisation a motivé l'obtention de fragments à partir de la version complète de son ADNc permettant de coder pour certaines parties spécifiques de la protéine complète dans un but de comparaison des potentiels effets cryoprotecteurs auprès des cellules préservées en leur présence. Une des causes principales de diminution de la survie chez les souches de *E. coli* cryoconservées serait liée à la dégradation de l'ADN et la perte de l'intégrité vitale (Alur et Grecz, 1975) induisant la mort cellulaire. Cette cause de diminution de la survie des cultures de *E. coli* cryoconservées met de l'avant des dommages internes à la cellule provoqués par le gel et justifient l'idée qu'une présence endogène de protéines potentiellement cryoprotectrices pourrait augmenter la survie des cultures après dégel. Notre hypothèse est qu'une protéine capable de diminuer la taille des cristaux de glace formés lors du gel/dégel comme TaENO pourrait donc potentiellement limiter les dommages engendrés à l'ADN et la structure des bactéries à la suite du gel/dégel.

4.1.1 Viabilité post-dégel déterminée par croissance sur milieu solide

Parmi les méthodes utilisées pour l'estimation de la viabilité bactérienne, certaines études se basent sur la relation entre le nombre de bactéries viables en culture et le nombre de colonies développées sur milieu solide (Pétri LB-Agar) à la suite de leur étalement à des volumes et densités équivalents (Park et Kim, 2018; Trinh et Lee, 2022). Cette méthode de quantification des bactéries viables nécessite des étapes de manipulation, de comptage des bactéries et oblige la mise en place de temps de culture. L'obtention de résultats par les méthodes dépendantes de la culture sur milieu solide requiert néanmoins un délai court

d'environ une semaine et est accéléré par le développement de techniques permettant l'automatisation de certaines étapes comme le comptage ou l'étalement (Trinh et Lee, 2022).

La première approche pour estimer la viabilité des bactéries cryoconservées dans les tests visant à l'évaluation des effets cryoprotecteurs de TaENO et de ses fragments s'est donc basée sur cette méthode. Les résultats obtenus pour les tests effectués montrent dans certains cas un lien entre l'expression des protéines d'intérêt et une augmentation de la survie des bactéries. Malgré la variabilité des résultats obtenus entre les répliques pour les tests de viabilité sur milieu solide, la production endogène du fragment C-terminal de la protéine TaENO chez les bactéries semble avoir entraîné un effet significatif sur la survie à la suite de la cryoconservation en présence de 10 et 15% de glycérol. Un résultat similaire chez les tests effectués avec la version complète de la protéine était néanmoins attendu pour participer à la validation de ce résultat. La grande variabilité des résultats obtenus et la difficulté de reproductibilité ont donc encouragé à l'exploration d'autres méthodes visant à mettre en évidence les effets des protéines sur la survie bactérienne après cryoconservation.

La variabilité entre les répliques et les difficultés à estimer avec précision la densité bactérienne des extraits cryoconservés et étalés sur milieu solide semblent en effet représenter la limite principale de ce test qui pourrait constituer une étape rapide et peu onéreuse à la sélection préliminaire de potentiels CPAs. Une voie d'amélioration du test pourrait se trouver dans la combinaison du test de viabilité sur milieu solide avec des méthodes de mesure de l'activité métabolique des bactéries comme le test de la résazurine pour diminuer la variabilité observée. Ce test permet d'estimer la viabilité par mesure de l'activité réductrice de cultures cellulaires et permet la prise en compte de l'activité métabolique des bactéries dans l'estimation de la viabilité (Costa *et al.*, 2021; Trinh et Lee, 2022). D'autres tests métaboliques mesurant la captation de certains substrats comme le glucose pourraient aussi être envisagés (Trinh et Lee, 2022) mais leur utilisation dans un test comprenant une protéine comme l'énolase du blé TaENO (enzyme catalysant la neuvième étape de la glycolyse, où elle convertit le 2-phosphoglycérate en phosphoénolpyruvate) faisant partie d'une voie de métabolisation du glucose d'un autre organisme demande l'évaluation préalable de la protéine au niveau du métabolisme des bactéries.

4.1.2 Viabilité post-dégel déterminée par cytométrie en flux

Dans l'optique de diminuer la variabilité entre les tests et d'avoir plus de contrôle sur l'homogénéité des cryoessais réalisés, une trousse permettant le comptage des bactéries à l'aide de la cytométrie en flux a

été utilisée. Les microsphères ainsi que la sonde fluorescente fournies avec la trousse ont permis la mise en place de tests permettant d'ignorer certaines étapes de manipulation (comptage, étalage, ...) et de culture tout en permettant l'observation de la réaction aux tests d'un grand nombre de bactéries en peu de temps. La sonde fournie (SytoBC – ThermoFisher) ne discriminant pas les populations bactériennes en fonction de leur viabilité, le PI a été utilisé pour mettre en évidence les bactéries mortes. Le PI est utilisé dans des tests similaires (Deng *et al.*, 2020; Stiefel *et al.*, 2015) pour sa faculté à être excrété/maintenu à l'extérieur des cellules vivantes empêchant sa fixation à l'ADN et ainsi la formation du complexe excitable par la longueur d'onde adaptée, provoquant un signal plus faible. Le PI permet ainsi la mise en évidence de la diminution de l'intégrité des parois bactériennes par l'incapacité des structure cellulaires à empêcher sa liaison à l'ADN et représente ainsi un moyen d'estimer la viabilité des bactéries qui diffère de l'estimation de leur capacité de former des colonies (Rosenberg *et al.*, 2019; Trinh et Lee, 2022).

Malgré l'utilisation d'un procédé différent pour l'estimation de la viabilité des populations bactériennes cryoconservées, les résultats obtenus par cette méthode n'ont pas permis de parvenir à la mise en évidence des effets cryoprotecteurs des différents CPAs testés, incluant celui du glycérol pourtant reconnu pour ses effets cryoprotecteurs auprès de cultures bactériennes (Hasan *et al.*, 2018). La discrimination des bactéries vivantes et mortes n'a pas été possible en utilisant le PI comme sonde de viabilité par l'absence de deux pics d'intensités distinctes dans la mesure du signal observé chez les cultures fraîches (non-congelées) et dégelées. Plusieurs concentrations de la sonde ont été utilisées sans parvenir à l'obtention de populations distinguables par leur signal. Le marquage au PI pour estimation de la viabilité des populations bactériennes est une méthode mise de l'avant comme pouvant induire une certaine variabilité et dont l'efficacité est sujette à certains facteurs expérimentaux qui pourraient affecter la comparaison d'échantillons traités avec du stress avec des témoins sans stress (Rosenberg *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2007; Stiefel *et al.*, 2015). La perméabilité des membranes bactériennes pouvant être affectée par les processus de gel/dégel, une méthode reposant sur la perméabilité et la capacité d'excrétion d'une sonde pour l'estimation de la viabilité des bactéries peut induire une certaine variabilité dans les résultats obtenus. De plus, cette méthode peut présenter certains biais concernant des cellules capables de réparer les dommages entraînés à leurs parois à la suite de leur remise en culture après dégel, ainsi que la fausse détection de sous populations bactériennes présentant un signal positif au PI sur l'extérieur de leurs parois (Ignatov *et al.*, 1982; Rosenberg *et al.*, 2019). Il a par exemple été démontré que le stress métabolique dû à des concentrations sublétales d'antibiotiques ou d'autres composés toxiques augmente la formation de

biofilms et/ou entraîne une teneur plus élevée en ADN extracellulaire dans les biofilms pouvant induire une surestimation de la mort bactérienne par liaison au PI (Rosenberg *et al.*, 2019).

Les tests réalisés auprès du modèle procaryote *E. coli* n'ont pas permis l'obtention de résultats permettant de mettre au point une méthode utilisant l'expression endogène de TaENO pour évaluer sa capacité cryoprotectrice. L'absence de l'évaluation préliminaire des effets de la présence de TaENO endogène sans modification du milieu de cryoconservation, ne permet pas de savoir si une amélioration de la survie était attendue dans les tests effectués. Néanmoins, l'incapacité à discerner la viabilité des populations bactériennes après dégel a aussi empêché l'atteinte de résultats attendus comme l'augmentation de la viabilité en présence du glycérol (Hasan *et al.*, 2018) Peu d'études tentent de faire des liens entre la présence de protéines endogènes et la survie des bactéries lors d'épreuves de gel/dégel, ces organismes étant généralement étudiés pour leur capacité pathogène et/ou leurs effets auprès d'autres cellules. Aussi, l'absence des protéines dans le milieu de congélation (à moins d'une libération des suites de la lyse de bactéries) pourrait limiter la capacité à freiner la formation et la croissance des cristaux de glace, un mécanisme qui contribue potentiellement à réduire les dommages structurels et à améliorer la survie des cellules lors de la cryoconservation (Chen *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2023). La diminution de la recristallisation de l'eau intracellulaire est souvent jugée d'importance moindre par rapport à celle du milieu externe qui est facilitée par une plus faible concentration en solutés et dont la cristallisation menace les membranes cellulaires (Muldrew et McGann, 1990).

Les deux méthodes mises en place avec le modèle *E. coli* utilisent donc des moyens de quantification de la viabilité qui diffèrent par la réponse cellulaire évaluée, la première méthode se base sur la capacité de formation de colonies des bactéries viables tandis que la deuxième se base sur la capacité des bactéries à diminuer la liaison d'un composé exogène à leur ADN. Les deux méthodes mènent à l'obtention de résultats dans un laps de temps limité (moins d'une semaine), la méthode reposant sur la cytométrie en flux requiert une quantité de manipulations diminuée et permet l'analyse précise d'un grand nombre d'événements dans les échantillons mais demande l'emploi d'un cytomètre ainsi qu'une certaine compréhension des techniques liées. Les résultats des tests obtenus démontrent néanmoins une grande variabilité et ne permettent pas de mettre de l'avant les effets attendus (pour les CPAs testés et les CPAs conventionnellement utilisés) dans l'application présente. Il serait possible d'améliorer ces méthodes en les intégrant à des manipulations supplémentaires permettant de lier la survie bactérienne à la mesure de la dégradation de l'ADN bactérien. Par exemple, la qPCR pourrait quantifier l'ADN intact ou fragmenté en

fonction de l'efficacité de l'amplification, permettant ainsi de détecter indirectement les cassures simples ou doubles brins (Lahtinen *et al.*, 2008). Le CometAssay offrirait une évaluation visuelle de la fragmentation de l'ADN à travers la migration électrophorétique, ce qui permettrait de distinguer différents niveaux de dommages. Ces approches compléteraient la méthode actuelle en fournissant des données plus spécifiques sur la nature des dégâts subis par l'ADN, ce qui pourrait offrir des pistes pour évaluer plus finement l'impact des conditions de gel/dégel sur la viabilité des bactéries (Bajpayee *et al.*, 2016). Les deux tests mis en place démontrent tout de même une méthode avec un potentiel d'être améliorée dans des buts de discriminer de façon préliminaire des CPAs présentant une potentielle activité cryoprotectrice. Un test reposant sur l'évaluation de la viabilité par remise en culture ou mesure de la dégradation de l'ADN bactérien sera cependant à préférer en comparaison à un test reposant sur la susceptibilité des bactéries aux sondes fluorescentes qui semble affectée par les processus de gel/dégel. Malgré le potentiel d'amélioration des tests, leur difficulté de mise en place a encouragé la poursuite de l'étude auprès de modèles plus représentatifs de ceux avec lesquels les effets cryoprotecteur des protéines d'intérêt ont pu être mis en évidence.

4.2 Développement de cryoessais avec les cellules HeLa

Toujours dans le but de développer une méthode simple et peu coûteuse de sélection préliminaire de protéines cryoactives, l'étude s'est orientée vers un modèle plus proche de celui auprès duquel les effets cryoprotecteurs de TaENO avaient été précédemment mis de l'avant (Chow-shi-yée *et al.*, 2016a; Chow-shi-yée *et al.*, 2020). Les cellules HeLa sont des cellules provenant d'une lignée de cellules cancéreuses immortalisée, présentant une structure semblable à celle d'une cellule mammifère (Underhill et Smales, 2007) et déjà utilisées en tant que modèle pour plusieurs applications dont certaines étudient leur réaction aux processus de cryoconservation (Bahari *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2017). Ces cellules constituent un modèle répandu et dont l'entretien est facilité par une grande disponibilité de réactifs et guides liés à sa culture (Lyapun *et al.*, 2019). Les tests réalisés auprès des cellules HeLa visent à mettre de l'avant les effets de l'ajout de protéines potentiellement cryoprotectrices dans le milieu de congélation sur la survie de cellules dégelées. Ces tests prennent un laps de temps comparativement plus long à ceux réalisés avec *E. coli* notamment à cause des temps de cultures des cellules HeLa. Cette dernière prend généralement plus longtemps à cause du temps de division des cellules qui correspond à une division en 18-24h comparativement à *E. coli* capable de se diviser toutes les 20-30 minutes en culture (~5-7 jours pour mener à l'obtention de $\sim 15 \times 10^6$ cellules pour l'expérimentation dans les conditions de culture appliquées) (Kumei *et al.*, 1989; Reshes *et al.*, 2008). Les tests mis en place reposent sur l'exclusion d'une sonde fluorescente

par les cellules en santé et la fixation auprès de l'ADN des cellules mortes, induisant un signal plus fort permettant la différenciation des cellules selon leur viabilité. Le PI est couramment utilisé comme sonde fluorescente pour mesurer la viabilité cellulaire en cytométrie en flux, son utilisation est préférée au bromure d'éthidium par la présence de deux charges positives dans sa structure chimique, diminuant son entrée dans les cellules vivantes qui peut causer un signal positif pour le PI auprès d'une cellule vivante (Ramirez *et al.*, 2010). L'estimation de la viabilité cellulaire par l'utilisation du PI a pour principale limite le fait que les cellules mourantes puissent encore conserver l'intégrité de leur membrane (limitant la formation du complexe excitable PI-ADN) pendant une période substantielle après une blessure ainsi qu'une capacité de la sonde fluorescente à diffuser au sein de certaines cellules vivantes, pouvant induire une certaine variabilité dans les résultats (Ramirez *et al.*, 2010).

Les résultats obtenus avec les cellules HeLa (Figures 3.3, 3.4 et 3.5) indiquent une meilleure survie pour les cellules cryoconservées en présence de la version complète de TaENO et encore meilleure pour le fragment correspondant à la moitié C-terminale de la protéine. La comparaison des résultats obtenus pour la survie des cellules en présence des protéines d'intérêt avec les cellules cryoconservées par les méthodes conventionnelles reposant sur l'utilisation du DMSO met de l'avant une efficacité similaire en particulier avec le fragment C-terminal de TaENO. Des essais préliminaires de remise en culture des cellules cryoconservées avec les protéines d'intérêt obtenues de façon recombinante n'ont pas été concluants, malgré des étapes de lavage préalables. Les cellules cryoconservées avec le DMSO ont pu être remises en culture, mettant de l'avant un possible effet des protéines d'intérêt sur la récupération des cellules après décongélation menant à des difficultés de remise en culture des cellules cryoconservées.

Pour investiguer la réponse des cellules HeLa à l'exposition aux protéines d'intérêt, des expériences d'immunobuvardage, pourraient être envisagées permettant d'observer l'effet sur l'expression de protéines spécifiques liées au stress chez les cellules HeLa (Grondin *et al.*, 2015; Underhill et Smales, 2007). Ces expériences utilisent des protéines qualifiées de « contrôle de charge » comme la β -actine ou GADPH (Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) généralement exprimées de façon constante dans les cellules pour normaliser l'observation de l'expression de protéines comprises dans des réponses cellulaires qu'il est intéressant d'étudier. De telles expériences sont déjà réalisées auprès des cellules HeLa et permettent de mettre de l'avant des effets sur la survie des cellules par caractérisation de l'expression de protéines liées aux voies de mort cellulaire comme l'apoptose (ex : caspase-3 clivée, ratio Bax/Bcl-2) et présentent ainsi une opportunité de compléter l'estimation de la viabilité des cellules présenté

précédemment (Carthy *et al.*, 1998; Chow-shi-yée *et al.*, 2020). Ces tests peuvent aussi permettre la mise en évidence de modifications dans des processus fonctionnels normaux des cellules en réponses aux tests, en caractérisant l'expression de protéines essentielles au développement normal des cellules HeLa, comme des protéines d'adhésion (intégrine β , cadhérine E) (Riikonen *et al.*, 1995).

Les tests réalisés, combinés avec des méthodes d'immunobuvardage pourraient mener à la mise en place d'une méthode préliminaire de tri pour les composés/protéines potentiellement cryoactifs selon leurs effets sur la survie et la fonctionnalité cellulaire en maintenant un coût et une accessibilité raisonnables. Cela implique l'utilisation de techniques accessibles dans des laboratoires standards, en s'assurant que les méthodes choisies ne soient pas seulement efficaces mais aussi réalisables avec des équipements et techniques courants. L'objectif est d'offrir une approche viable, adaptable et économiquement soutenable pour identifier les protéines cryoactives. Autrement, les effets cryoprotecteurs du fragment C-terminal de la protéine TaENO ainsi que la version complète de la protéine seront à étudier au niveau de la réponse cellulaire observée pour confirmer les résultats des tests de viabilité effectués ainsi que les potentielles interactions relevées. Les essais avec les autres fragments (TaENO-MR, TaENO-N-terminal) obtenus à partir de la version complète de l'ADNc de TaENO demeurent à être effectués pour contribuer à la mise en évidence du domaine cryoactif de TaENO qui serait au vu des résultats obtenus, potentiellement porté par le fragment C-terminal de la protéine.

4.3 Évaluation de l'effet des protéines de blé cryoactives sur la survie post dégel des organoïdes

Les tests réalisés auprès des organoïdes de cerveau et de pancréas ont été effectués avec les 4 protéines du blé d'intérêt, à savoir, TaENO, TaBAS, TaIRI et WCS120. Les organoïdes sont un système qui, sous des conditions de culture appropriées, peut maintenir sa population cellulaire par un processus d'auto-renouvellement, tout en s'auto-organisant, comprenant divers types de cellules, accomplissant certaines fonctions spécifiques et formant des structures spatiales visant à récapituler autant que possible l'architecture et la fonction des tissus *in vivo* (Yang *et al.*, 2023). Ils constituent aussi un modèle étant la plupart du temps plus accessible que les modèles animaux pour des applications de manipulation et de recherche extensive, comme l'étude de l'occurrence, le développement et la progression de pathologies (Yang *et al.*, 2023; Zhao *et al.*, 2022). Les organoïdes de cerveau utilisés sont obtenus à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) en utilisant des signaux inducteurs spécifiques à des étapes définies pour orienter les cellules vers une destinée mésencéphalique. La culture 3D réalisée permet aux cellules de s'autoorganiser en formant des structures imitant le développement du mésencéphale ainsi que

certain types cellulaires y étant retrouvés comme les neurones, notamment les neurones dopaminergiques (important dans leur rapport à la maladie de Parkinson pour laquelle les organoïdes représentent un modèle d'étude) ainsi que des oligodendrocytes et d'autres cellules (Mohamed *et al.*, 2021). Les organoïdes pancréatiques sont développés à partir d'iPSCs dont la différenciation amène à la formation de cellules endocrines, y compris des cellules bêta productrices d'insuline, des cellules alpha, des cellules delta, ainsi que d'autres types cellulaires pancréatiques. Ces organoïdes visent à imiter la structure et la fonction des îlots de Langerhans, mettant de l'avant leur importance pour la recherche sur le diabète (Tran *et al.*, 2020).

Les principaux défis à considérer lors de la cryoconservation de ce genre de structures incluent la perturbation des interactions cellulaires établies, les dommages potentiels aux cellules causés par la croissance des cristaux de glace lors du gel/dégel, ainsi que la tolérance différente des cellules aux variations osmotiques et aux CPAs au sein d'un même environnement 3D (Rogulska *et al.*, 2023). Le développement de stratégies permettant la conservation à grande échelle et prolongée des organoïdes est motivée par une disponibilité encore limitée ainsi que des difficultés de transport et de maintien de ce modèle. Les effets cryoprotecteurs de certaines des protéines utilisées ont déjà été mis de l'avant auprès de types cellulaires similaires à ceux retrouvés dans la structure des organoïdes, notamment les cellules pancréatiques (Chow-shi-yée *et al.*, 2016a; Grondin *et al.*, 2015). Les tests réalisés demeurent néanmoins exploratoires au vu du peu de données préalables disponibles sur l'interaction entre les protéines d'intérêt auprès de certains types cellulaires et les structures 3D complexes constituant les organoïdes, notamment ceux de cerveau. Les cultures d'organoïdes présentent aussi une hétérogénéité significative et une complexité variable dans leur composition cellulaire (Zhao *et al.*, 2022) pouvant amener un biais dans leur utilisation et l'homogénéité des résultats obtenus. Les deux types d'organoïdes utilisés dans cette étude étaient en effet sujets à une certaine hétérogénéité, les organoïdes de cerveaux avaient un diamètre moyennant 1 mm tandis que les organoïdes de pancréas avaient un diamètre compris entre 50 et 200 μm (Figures 3.11). Chaque série de cryoessais a été effectuée avec une même génération d'organoïdes mais les générations rendues disponibles diffèrent les unes des autres par le stade de maturité et la taille des organoïdes (entre séries et au sein même de la série) ajoutant un degré de variabilité quant à la taille, le comportement et la densité cellulaire des structures concernées. La complexité de ce système induit aussi de la variabilité dans sa réponse à divers protocoles dont les tests visant à sa cryoconservation. Le manque de méthodes permettant d'assurer un contrôle de la qualité des approches utilisées est un défi majeur dans l'établissement d'un protocole de stockage standardisé (Rogulska *et al.*, 2023). Les deux principales

approches de cryoconservation, à savoir le gel par vitrification ou le gel par diminution lente de la température ont prouvée pouvoir être appliquées pour la cryoconservation des organoïdes. Une possibilité complémentaire consiste à préserver les organoïdes sous forme de cellules simples dissociées, permettant d'appliquer des techniques spécifiques adaptées aux besoins de chaque type cellulaire (Rogulska et al., 2023). Bien que cette méthode simplifie certains paramètres complexes liés à la cryoconservation d'organoïdes entiers, elle nécessite une remise en culture ou une mise en culture initiale dans le cas des cellules progénitrices, ce qui entraîne des délais et des coûts supplémentaires. Par ailleurs, la cryoconservation d'agrégats cellulaires issus d'organoïdes dissociés est également une avenue explorée. Cependant, elle présente les mêmes limitations liées à la réassociation et à la réorganisation des organoïdes après décongélation, ce qui peut influencer leur fonctionnalité. La mise en place de méthodes reposant sur l'utilisation de technologies émergentes comme l'utilisation de cryoprotecteurs d'origine naturelle est une étape essentielle dans le dépassement des limites atteintes par la cryoconservation de ce modèle complexe.

4.3.1 Diffusion des protéines marquées

Des tests de diffusion ont été effectués dans le but de valider la capacité des protéines d'intérêt à pénétrer une structure pluricellulaire complexe comme les deux types d'organoïdes utilisés. Pour caractériser la diffusion des protéines d'intérêt, elles ont été marquées avec une sonde permettant de suivre leur localisation dans la structure de l'organoïde. Ces tests sont d'un intérêt particulier auprès de structures comme celle des organoïdes pour lesquels le milieu intercellulaire présente un site de nucléation de cristaux de glace important, souvent ignoré dans les tests de cryoconservation effectués auprès de cellules simples (Pereira *et al.*, 2020). Les tests réalisés ont permis de mettre de l'avant une capacité de diffusion à l'intérieur de la structure pour toutes les protéines testées dans des intervalles de temps réduits. Une possible accumulation des protéines a pu être observée avec TaBAS et TaIRI chez les organoïdes pancréatiques et avec TaBAS, TaIRI et WCS120 chez les organoïdes cérébraux (Figures 3.9 et 3.10). Cette accumulation pourrait être liée à une interaction spécifique entre les protéines et certains types cellulaires composants l'organoïde mais aussi à une réaction cellulaire visant l'exclusion des protéines dans l'espace intercellulaire ou dans des structures spécifiques. Bien que les tests réalisés permettent de suivre la protéine marquée dans l'ensemble de la structure, ils ne permettent pas de déterminer si les protéines marquées pénètrent à l'intérieur des cellules de l'organoïde, ni d'émettre une hypothèse sur la localisation cellulaire des protéines et/ou les types cellulaires les plus affectés. Cependant, les tests réalisés fournissent des informations précieuses sur les durées d'exposition nécessaires pour obtenir une diffusion homogène

de la protéine dans la structure et constituent un préalable essentiel en vue de réaliser des tests de viabilité. Une avenue à explorer pour caractériser plus amplement la diffusion et le devenir des protéines au sein des cellules des organoïdes serait de vérifier la colocalisation des protéines d'intérêt, accumulées dans certains tests, avec notamment des marqueurs spécifiques à certains types cellulaires constituant les organoïdes afin de mettre de l'avant de potentielles interactions avec des types cellulaires spécifiques. De tels marquages sont réalisés dans des études portant notamment sur le développement des organoïdes, combinant l'utilisation d'anticorps spécifiques et des modifications géniques ciblées. Ces dernières consistent par exemple à insérer une séquence codante pour une protéine fluorescente, comme la GFP (*Green Fluorescent Protein*, protéine fluorescente verte), dans la séquence d'une protéine cellulaire d'intérêt. Un exemple d'application est le marquage des astrocytes via l'expression de la GFP sous le contrôle du promoteur de la GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*, protéine acide fibrillaire gliale), un marqueur clé des cellules gliales (Dekkers *et al.*, 2020; Rodriguez-Gatica *et al.*, 2022; Yakoub et Sadek, 2019). Ces approches permettent à la fois de distinguer les types cellulaires présents dans l'organoïde et d'identifier certaines structures subcellulaires, telles que les synapses neuronales (Yakoub et Sadek, 2019). Elles offrent ainsi une possibilité d'observer l'organisation cellulaire au sein des structures tridimensionnelles, apportant un complément aux marquages immunohistochimiques classiques. Cependant, les manipulations géniques, comme l'ajout de séquences codantes pour la GFP, doivent être effectuées en amont par les chercheurs développant les organoïdes *in vitro*, contrairement à l'utilisation d'anticorps spécifiques qui nécessite des étapes de fixation et de coloration pouvant être réalisée en aval lors des essais.

4.3.2 Viabilité des organoïdes cryoconservés en présence des protéines de blé

L'estimation de la viabilité d'un organisme des suites de sa cryoconservation est une des étapes préliminaires dans le développement d'une méthode adaptée à ce type d'organisme. Les tests de viabilité sont souvent applicables à une large gamme de types cellulaires car reposant sur des mécanismes communs, tandis que les tests de fonctionnalité, qui leur font la plupart du temps suite, sont souvent spécifiques à un type de cellules précis. La multiplicité des types cellulaires présents dans la structure d'un organoïde met donc de l'avant les tests de viabilité comme une meilleure alternative lors de l'étude de la survie d'organoïdes entiers après cryoconservation. Un problème significatif se présente néanmoins pour le dépistage de la mort cellulaire dans les organoïdes, en effet leur structure 3D permet une évaluation visuelle qualitative de la mort cellulaire, mais limite l'analyse quantitative de la mort cellulaire (Bode *et al.*, 2019). La complexité des structures des organoïdes, avec des couches multiples et des types cellulaires

divers, complique l'analyse quantitative uniforme. Les essais de viabilité globaux (comme ceux effectués dans cette étude) peuvent manquer de sensibilité pour détecter des différences subtiles ou pour cibler des cellules spécifiques au sein de l'organoïde. De plus, l'imagerie des cultures cellulaires 3D est aussi rendue difficile par leur épaisseur et densité cellulaire entraînant un phénomène de diffusion de la lumière qui limite la pénétration de celle-ci (Costa *et al.*, 2019). Ces limites sont généralement surmontées dans les protocoles grâce à l'utilisation de techniques d'analyse adaptées aux organoïdes, qu'ils soient dispersés (avec une structure 3D modifiée par des traitements chimiques et/ou physiques), rendus transparents, ou sectionnés (Dekkers *et al.*, 2020). Notre étude a mis en place deux approches permettant l'observation de la structure cellulaire interne des organoïdes, à savoir la clarification basée sur le protocole CUBIC et la découpe histologique sur microtome. Ces deux méthodes ont permis la visualisation de la structure interne de l'organoïde qui était inatteignable auprès des deux types d'organoïde au préalable des traitements et permet une observation qualitative globale de la structure en fonction des tests réalisés, dans notre cas des tests visant à estimer la viabilité de la structure. Les tests réalisés ne permettent cependant pas d'atteindre le degré de précision d'analyse quantitative permise par la dissociation des cellules composant l'organoïde pour étudier leur réponse individuelle. L'emploi des techniques de transparence et de coupe histologiques mises en œuvre nécessite une étape de fixation permettant d'assurer l'arrêt des processus biologiques pouvant affecter les réponses à observer en aval. Cette étape de fixation a été mise en lien dans certaines études avec une perte de la structure 3D des organoïdes (Dekkers *et al.*, 2020), phénomène observé dans certains cas lors de l'exposition à la PFA pendant plus de 30 min pour les organoïdes pancréatiques et plus de 1h pour les organoïdes de cerveau dans les tests réalisés. Cette perte de structure a aussi pu être observée lors d'étapes subséquentes de manipulation des organoïdes et pourrait être liée au processus de fixation, au maintien en culture ou aux traitements (clarification, manipulation, sectionnage). La perte de structure a donc été un paramètre délibérément ignoré dans la mise en place des tests visant l'estimation de la viabilité des organoïdes effectuée tant qu'elle permettait tout de même la manipulation de l'organoïde. Les résultats obtenus auprès des organoïdes de cerveau mettent de l'avant des résultats sur la survie comparables entre les tests réalisés en présence des protéines TaBAS, WCS120 et TaENO par rapport à ceux réalisés en présence de la solution de cryoconservation commerciale 3dGRO (Figure 3.11). Les observations obtenues semblent indiquer une amélioration de la viabilité cellulaire post dégel dans le centre de la structure par rapport aux essais en absence de cryoprotecteurs (donnée non présentée) ou avec d'autres conditions (ex : TaRI-2) mais demandent à être vérifiés pour les associer à de potentiels effets cryoactifs des protéines. Une mort cellulaire plus forte dans la périphérie des organoïdes en contact avec le milieu a été observée dans quasiment toutes les conditions, ce qui était à attendre

considérant le fait que ces cellules sont les plus sujettes aux dommages induits par la formation de glace extracellulaire et les gradients osmotiques (Bojic *et al.*, 2021; Peter *et al.*, 2022). Il est à noter que le protocole associé au produit commercial utilisé incite l'utilisateur à cryoconserver des agrégats provenant d'organoïdes dissociés (Annexe F). Toutefois, cette approche n'a pas été suivie afin de réduire les manipulations liées à la dissociation et réassociation des organoïdes, mais également pour permettre l'observation directe des atteintes potentielles à leur structure tridimensionnelle, un paramètre critique pour évaluer l'impact des protocoles de cryoconservation sur leur intégrité morphologique. La dissociation des organoïdes en agrégats ou en cellules simples est une option mise de l'avant dans certaines publications pour ses intérêts d'analyse quantitative (Debruyne *et al.*, 2023). Considérant les capacités de régénération et réassociation des organoïdes en cultures, cette option est à prendre en compte pour assurer la cryoconservation des organoïdes à l'aide des techniques et moyens actuels (Fitzgerald *et al.*, 2019; Lukonin *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2022).

Toujours d'un point de vue méthodologique, la congélation lente a été la méthode employée pour la congélation des organoïdes en vue de leur stockage dans l'azote. Une diminution de température de l'ordre de 1°C par minute a été atteinte par l'utilisation de contenants pour cryotubes MrFrosty (Mr. Frosty Freezing Container – Thermo Fisher Scientific) reposant sur la diminution de température homogène de l'alcool isopropylique. Cette méthode a été préférée à la vitrification en raison de la dose réduite de cryoprotecteurs nécessaire pour les organoïdes, de la simplicité des techniques utilisées, ainsi que des résultats positifs obtenus lors de tests préalables sur d'autres types cellulaires utilisant une méthode de congélation similaire. Il est cependant à noter que la vitrification est jugée applicable aux organoïdes, certains protocoles ont déjà prouvé pouvoir atteindre une survie acceptable auprès d'organoïdes vitrifiés, souvent meilleure qu'en employant des méthodes de congélation lentes (Mashouf *et al.*, 2024). Les hautes concentrations de CPAs nécessaires pour les protocoles de vitrification obligent néanmoins la réalisation d'étapes de lavages des structures cryoconservées souvent plus poussées que pour les méthodes de congélations lentes, ces étapes de lavages peuvent provoquer des dommages osmotiques et doivent donc être réalisées de manière rigoureuse pour ne pas endommager les structures après dégel (Rogulska *et al.*, 2023).

Parmi les tests effectués, les effets du DMSO et de l'albumine sérique bovine (BSA) ont aussi été testés pour leurs effets cryoprotecteurs auprès des organoïdes. Le BSA a été utilisé en guise de contrôle de l'effet de l'ajout d'une protéine simple dans le milieu de cryoconservation des organoïdes. Le BSA est connu pour

avoir de faibles effets positifs sur la diminution de la taille des cristaux de glace ainsi que la stabilisation des membranes, il n'a pas d'activité spécifique auprès du métabolisme des cellules et n'agit qu'auprès des propriétés du milieu lors de leur cryoconservation (Bronshyeyn et Steponkus, 1995; Cabrita *et al.*, 2001; Rosato et Iaffaldano, 2013). Le DMSO est un cryoprotecteur standard utilisé dans une grande partie des protocoles de cryoconservation et des solutions de cryoconservation commercialisées. Ses effets de modification des propriétés chimiques des solutions aqueuses induisent une forte inhibition de la formation des cristaux de glace, en grande partie responsable de son intérêt en tant que CPA. Son utilisation est critiquée pour sa large gamme d'effets auprès de certains types cellulaires dont certains ont été qualifiés de néfastes (Awan *et al.*, 2020). L'utilisation du DMSO demeure répandue et a su démontrer une certaine efficacité lors de son utilisation pour la préservation d'organoïdes en condition de congélation lente (Pereira *et al.*, 2020). Les tests réalisés en présence de BSA auprès des organoïdes de cerveau (pas de test réalisé pour les organoïdes de pancréas) ont obtenu des résultats similaires à ceux obtenus en présence de TalRI-2. Plusieurs essais n'ont pas abouti à une observation après congélation dû à une perte d'intégrité limitant la manipulation de l'échantillon. Cette perte de structure post-dégel peut être liée à une cryoprotection moindre de l'échantillon conférée par la simple présence de BSA dans le milieu de cryoconservation. Les organoïdes cryoconservés en présence de DMSO ont obtenu des résultats comparables à ceux obtenus pour les organoïdes cryoconservés en présence de la solution commerciale 3dGRO pour les essais réalisés avec une concentration de 5% et 10%. Certaines études mettent de l'avant des résultats similaires obtenus pour la cryoconservation d'organoïdes en présence de ces deux concentrations d'où leur utilisation dans les essais (Smagur *et al.*, 2013). Le DMSO notamment grâce à sa grande perméabilité demeure un standard employé dans plusieurs protocoles (Mashouf *et al.*, 2024; Rogulska *et al.*, 2023) ainsi que dans certaines solutions commerciales (ex : CryoStor®-BioLife Solutions, CellBanker™-Cellenion, CoolCell®-BioCision) développées pour la cryoconservation des organoïdes malgré la tendance à la réduction de son utilisation. Parmi les idées mises de l'avant visant à la réduction de son utilisation se trouve la mise en place de cocktails de CPAs avec des quantités réduites voire nulles de DMSO permises par la présence d'autres cryoprotecteurs. La réduction de la concentration de DMSO dans le milieu de cryoconservation des organoïdes a déjà été mise de l'avant dans certaines publications et met de l'avant la possibilité de réduire cette concentration d'avantage par l'utilisation de CPAs efficaces avec moins d'effets néfastes (Erol *et al.*, 2021; Smagur *et al.*, 2013). Notre étude s'est penchée sur l'utilisation combinée des protéines d'intérêts utilisées en absence de DMSO dans le but de mettre de l'avant une amélioration de la cryoconservation des organoïdes en présence de plusieurs protéines avec des activités potentiellement variées. La plupart des tests effectués en présence de plus de 2 protéines ont mené à une

perte complète de structure de l'organoïde après dégel et des observations similaires à celles faites auprès d'organoïdes cryoconservés en l'absence de CPAs. La perte de structure pourrait être associée à une absence d'effet cryoprotecteur lié à la faible concentration de chaque protéine dans le milieu ou à des effets adverses liés à l'exposition des cellules à plusieurs protéines. Les tests réalisés en présence d'une combinaison de TaENO et TaBAS ont obtenus des résultats comparables à ceux obtenus pour chacune des protéines seules et ne permettent pas de mettre de l'avant un effet combiné de ces protéines. Les tests réalisés en présence d'une combinaison de TaIRI et WCS120 n'ont pas pu aboutir à une observation de la survie de la structure, empêchant la confirmation de l'effet combiné de ces protéines qui avait été mis de l'avant auprès d'autres types cellulaires (Chow-shi-yée *et al.*, 2020). La quantité d'échantillons vivants disponibles ainsi que le manque de données préalables ont été limitantes dans la mise au point de solutions composées de plusieurs CPAs et leur mise en place demande de plus amples tests de caractérisation des effets des protéines d'intérêt auprès des différents types cellulaires.

Pour visualiser l'induction apoptotique dans les organoïdes, des tests d'immunofluorescence ont été réalisés dans le but de détecter l'activation de la caspase-3 (Figure 3.13), une caspase effectrice clé impliquée dans la dégradation des substrats cellulaires essentiels à la structure et à la fonction cellulaire lors de l'apoptose. La mesure de l'apoptose par l'induction de caspases dans les tissus cryoconservés est une donnée considérée intéressante dans plusieurs études grâce à sa capacité de mesure et localisation de la mort cellulaire programmée (Xu *et al.*, 2010). Les essais de marquages ont permis la mise en évidence d'une induction apoptotique faible chez les organoïdes de cerveau frais ultérieurement utilisés pour les tests de cryoconservation ainsi qu'une induction plus importante, variable entre les tests, de l'apoptose chez les cellules des organoïdes cryoconservés. La compréhension des processus apoptotiques dans un organoïde lors de sa cryoconservation est une étape essentielle dans le développement de solutions de cryoconservation adaptées aux besoins d'une telle structure. Avec l'émergence de CPAs ciblant l'inactivation des voies apoptotiques dans le but de diminuer la mort cellulaire, ces observations représentent aussi un moyen d'inclure de tels composés dans les études subséquentes. Des composés comme les ROCKi (Inhibiteur de *Rho-associated protein kinase*) dont Y-27632 permettent en effet la diminution de l'activation de ces voies, résultant en une amélioration de la survie cellulaire (Gonzalez-Martinez et Gibson, 2023; Xue *et al.*, 2024). Il est à noter que bien que pouvant améliorer la survie cellulaire, l'application de ces composés n'a pas été liée avec une résistance accrue des cellules aux dommages physiques provoqués par la cristallisation de la glace notamment et leur intérêt en cryoconservation outre l'inhibition de l'apoptose doit encore être caractérisé (Xu *et al.*, 2010).

Les tests de cryoconservation et de caractérisation des effets cryoprotecteurs des protéines réalisés auprès des organoïdes de cerveau et de pancréas ont permis la mise en évidence de difficultés d'atteinte d'une survie acceptable des structures entières et ce même en présence de cryoprotecteurs connus pour leur efficacité. Les tests réalisés en présence de certaines protéines d'intérêt semblent mettre de l'avant des effets équivalents sur la survie des cellules des organoïdes que ceux atteints avec les CPAs généralement utilisés mais nécessitent de plus amples essais avant d'être validés pour des tests plus approfondis. La difficulté d'entretien, de manipulation et d'utilisation de ce système dans des méthodes standards de cryoconservation et d'estimation de sa viabilité/fonctionnalité avant et après congélation ont été les limites principales des essais effectués. Certains moyens de contournement sont proposés dans ce travail pour améliorer les tests régulièrement utilisés auprès de cellules simples en culture, et pourraient mener à une utilisation auprès de structures complexes comme les organoïdes. Si l'utilisation de marquages spécifiques à certains types et structures cellulaires présents dans les organoïdes utilisés a déjà été discutée (cf. section 4.3.1), d'autres moyens d'amélioration des techniques décrites demeurent et pourraient être explorés dans de futurs tests. Le protocole de transparisation mis en place dans cet étude (CUBIC) est par exemple un protocole adapté originalement pour la transparisation d'organes entiers de souris (Matsumoto *et al.*, 2019). Bien qu'ayant prouvé une certaine efficacité dans les tests réalisés, d'autres protocoles spécifiquement adaptés à la transparisation d'organoïdes, souvent d'un type spécifique, ont été rapportés dans la littérature et pourraient être plus appropriés. Parmi eux figurent des exemples comme le protocole SHIELD (Park *et al.*, 2019) pouvant être adapté pour une transparisation satisfaisante des organoïdes (Albanese *et al.*, 2020), ou encore certains protocoles DISCO (Molbay *et al.*, 2021) ayant prouvé être adaptables notamment pour les organoïdes de cerveau (Renner *et al.*, 2020). Certains de ces protocoles sont présentés comme capables de préserver la structure 3D des organoïdes, la fluorescence des protéines, l'antigénicité, les transcrits et ce sous plusieurs gammes de conditions (Park *et al.*, 2019). Ces facteurs pourraient permettre l'obtention de plus d'information quant au devenir des cellules constituant les organoïdes après leur congélation, une meilleure mise en évidence de certains dommages entraînés par le gel/dégel aux structures et surtout une plus grande flexibilité au niveau de la manipulation de ces échantillons précieux.

Pour ce qui est relatif à l'évaluation de la viabilité des organoïdes, le test mis en place reposant sur la capacité de formation de complexes excitables avec les sondes fluorescentes utilisées semble présenter des limites, en particulier pour la quantification précise de la mort cellulaire. Plusieurs autres méthodologies permettent d'évaluer la viabilité et les effets de la cryoconservation, bien qu'elles

impliquent une dissociation ou une altération irréversible des organoïdes, rendant impossible l'observation directe de leur structure post-dégel. Par exemple, des techniques comme la qPCR, la cytométrie en flux ou l'immunobuvardage nécessitent une dissociation ou une lyse des organoïdes. Ces étapes empêchent toute évaluation de leur intégrité structurale et imposent une remise en culture/redifférenciation dans le cas d'une réutilisation après dégel, ce qui va à l'encontre de la volonté de préserver des spécimens utilisables directement post-congélation. La cytométrie en flux, bien qu'efficace pour les cellules isolées, est difficilement applicable aux organoïdes en raison de leur structure hétérogène et de leur taille variable. Son principe reposant souvent sur l'utilisation de sondes similaires à celles utilisées dans l'étude présente, en plus de sa difficulté d'application aux structures 3D des organoïdes, en ferait une alternative moins fiable que la microscopie (Dominijanni *et al.*, 2021). De son côté, l'immunobuvardage pourrait permettre une analyse fine de protéines d'intérêt mais pose des défis liés à la diversité cellulaire des organoïdes, rendant l'interprétation des profils protéiques plus complexe pour une évaluation quantitative générale de la viabilité. Cependant de tels tests pourraient servir dans le cadre de l'évaluation de la toxicité des protéines présentées ou dans la détection de certaines réponses de stress post-dégel. Les AFPs peuvent dans certains cas entraîner une certaine cytotoxicité malgré leur capacité d'inhibition des dommages entraînés par les processus de gel/dégel (Naing et Kim, 2019). L'impact de cette cytotoxicité sur la survie prend généralement place à de hautes concentrations des AFPs mais peut être observé en étudiant l'induction de mécanismes de défense ou de la réaction cellulaire au stress. Aucune donnée préalable n'est disponible quant à l'effet de l'exposition des types cellulaires utilisés aux protéines d'intérêt, ce qu'une étude de détection pourrait déceler en s'appuyant notamment sur des marqueurs spécifiques aux agrégosomes et corps d'inclusion (Shen *et al.*, 2011). Des expériences d'immunobuvardage pourraient ainsi caractériser l'effet de l'exposition aux protéines d'intérêt et/ou des processus de gel-dégel sur l'expression de protéines liées à des réponses de stress (ex : p53) ou de défense (ex : NF- κ B (facteur nucléaire kappa B), Nrf2 (Facteur nucléaire érythroïde 2 lié)) connus (Jazvinšćak Jembrek *et al.*, 2021). De tels tests pourraient ainsi permettre une évaluation de la réponse des cellules des organoïdes au contact des protéines d'intérêt à différentes durées et concentrations pour éviter tout effet cytotoxique dans les expériences effectuées en aval. Quant aux analyses par qPCR, elles ont été planifiées dans cette étude, bien que non réalisées. Elles s'appuieront sur l'évaluation de l'expression de marqueurs clés des stades de génération des organoïdes pour déterminer si la cryoconservation affecte ces stades, par exemple en entraînant une perte ou une régression développementale. Pour les organoïdes cérébraux, l'analyse inclurait des marqueurs tels que Nestin et SOX2, qui reflètent la neurogenèse précoce, ainsi que MAP2, indicatif de neurones matures, et VEGFA, lié à l'angiogenèse, suggérant une maturation

avancée (Mohamed *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2021; Yakoub et Sadek, 2018). Pour les organoïdes pancréatiques, des gènes comme PDX1 (progéniteurs pancréatiques), INS (insuline, cellules β) et NKX6.1 (progéniteurs endocriniens) seraient ciblés, permettant de suivre la différenciation pancréatique (Aigha et Abdelalim, 2020; Ebrahim *et al.*, 2022). Ces analyses, bien qu'elles ne permettent pas d'observer la structure des organoïdes, fourniraient des informations précieuses sur leur viabilité et leur fonctionnalité après dégel, non accessibles par des approches strictement structurales comme celles utilisées ici.

CONCLUSION

La cryoconservation est un des moyens majeurs d'améliorer la disponibilité de matériaux vivants et d'en diminuer le gaspillage pour des applications cliniques ainsi qu'en recherche, autant fondamentale qu'appliquée. Les protocoles de cryoconservation reposent actuellement sur l'emploi de composés présentant une certaine cytotoxicité et limite ainsi les potentielles utilisations des matériaux cryoconservés après dégel. La recherche mise de l'avant dans cette étude vise à développer des méthodes pour la sélection et l'utilisation de composés issus des mécanismes naturels de résistance au gel observés chez certains organismes. Les composés utilisés sont des protéines du blé (*Triticum aestivum*) chez lequel elles pourraient participer à la tolérance au gel et aux basses températures auxquelles le blé est naturellement confronté. Parmi elles se trouvent, TaBAS1, TaENO, WCS120 et TaIRI-2, dont les effets cryoconservateurs ont été mis de l'avant préalablement dans des études visant à estimer l'effet sur la survie de leur présence dans le milieu de congélation de certains types cellulaires dont les hépatocytes de rat et les cellules sécrétrices d'insuline INS832/13 (Chow-shi-yée *et al.*, 2016a; Chow-shi-yée *et al.*, 2020). Ces protéines ont donc été utilisées pour estimer les effets de leur présence sur la viabilité de différents modèles et systèmes cellulaires lors de leur cryoconservation dans le but de développer des méthodes permettant d'évaluer leur efficacité relative comme cryoprotecteurs. Les tests ont été réalisés dans le but de réduire les ressources nécessaires à la détection de cryoprotecteurs émergents et de valider les effets cryoprotecteurs observés précédemment sur des cultures cellulaires simples dans un système multicellulaire complexe comme les organoïdes. L'objectif était de développer une méthode efficace, rapide et peu coûteuse pour tester les protéines, tout en initiant les études sur un système plus complexe que ceux utilisés jusqu'à présent.

Les tests effectués auprès du modèle procaryote *E. coli*, se présentent comme une alternative rapide aux protocoles nécessitant la production et purification de protéines en vue de leur utilisation en cryoconservation en présentant une méthode de tri préliminaire des protéines en fonction de leurs activité cryoprotectrice auprès du système utilisé pour leur production directement. Ils constituent aussi la méthodologie associée au coût le plus faible parmi celles mises en place dans cette étude. La difficulté d'observer un effet positif sur la survie des bactéries de la présence du glycérol dont les effets cryoprotecteurs sont reconnus et largement utilisés, est un des principaux facteurs ayant compliqué l'analyse des résultats obtenus en utilisant le modèle *E. coli*. La variabilité des résultats obtenus, malgré l'emploi de différentes méthodes d'estimation de la viabilité ainsi que l'incapacité d'obtention de certains

résultats attendus ont encouragé notre étude à l'utilisation d'autres modèles vivants pour l'estimation des effets cryoprotecteurs des protéines d'intérêt. Le modèle *E. coli* pourrait tout de même présenter une avenue à explorer pour le développement de tests préliminaires en cryoconservation, encouragé par la rapidité et la facilité de mise en place des tests. Certains essais utilisant des approches différentes pour estimer la viabilité des cultures sont proposés et pourront être explorés pour mener au potentiel développement d'une méthode de tri rapide des protéines cryoprotectrices en utilisant le système *E. coli*. La détermination de l'effet de l'ajout exogène de protéines auprès de ce modèle sera aussi à tester pour mettre de l'avant des effets sur la survie lors de la cryoconservation qui n'avaient pas pu être observés dans les expériences avec production endogène des protéines d'intérêt.

Le deuxième modèle cellulaire sur lequel cette étude s'est penchée sont les cellules HeLa, cellules tumorales humaines immortalisées largement utilisées dans la recherche scientifique. Ces cellules se caractérisent par leur capacité à se diviser indéfiniment en culture et présentent une structure typique des cellules eucaryotes souvent plus proche des applications recherchées en cryoconservation en comparaison au modèle *E. coli*. Une activité cryoprotectrice significativement plus importante pour la moitié C-terminale de la protéine TaENO, par rapport à la protéine complète a été obtenue dans les tests réalisés. Ces résultats mettent de l'avant la présence d'un domaine cryoprotecteur de la protéine dans cette partie de la protéine et son efficacité comparable au DMSO dans les tests effectués. La caractérisation de ce domaine pourra être effectuée pour déterminer la séquence ou la structure d'un nouveau domaine cryoactif. Cela permettra d'identifier des protéines dans les bases de données qui pourraient posséder des capacités cryoprotectrices jusque-là ignorées. L'approche présentée permet d'obtenir les effets cryoprotecteurs attendus pour le DMSO et les protéines testées. Elle démontre un potentiel préliminaire avec une bonne reproductibilité, ce qui facilite le tri des protéines en fonction de leurs effets en cryoconservation. Les résultats de ces tests pourront être confirmés auprès d'autres types cellulaires pour gagner en confiance. La poursuite des tests impliquera l'évaluation de la viabilité cellulaire en utilisant des méthodes alternatives à celles employées (fluorescence PI/Calcéine-AM) ainsi que la réalisation de tests fonctionnels supplémentaires. Ces essais fourniront des informations plus détaillées sur le mode d'action des protéines testées.

Les essais réalisés auprès des organoïdes de cerveau et de pancréas se situent dans un optique exploratoire auprès de ce système dont la cryoconservation est très difficile à accomplir en garantissant la viabilité et fonctionnalité de l'organoïde après dégel. Considérant les potentielles applications cliniques de

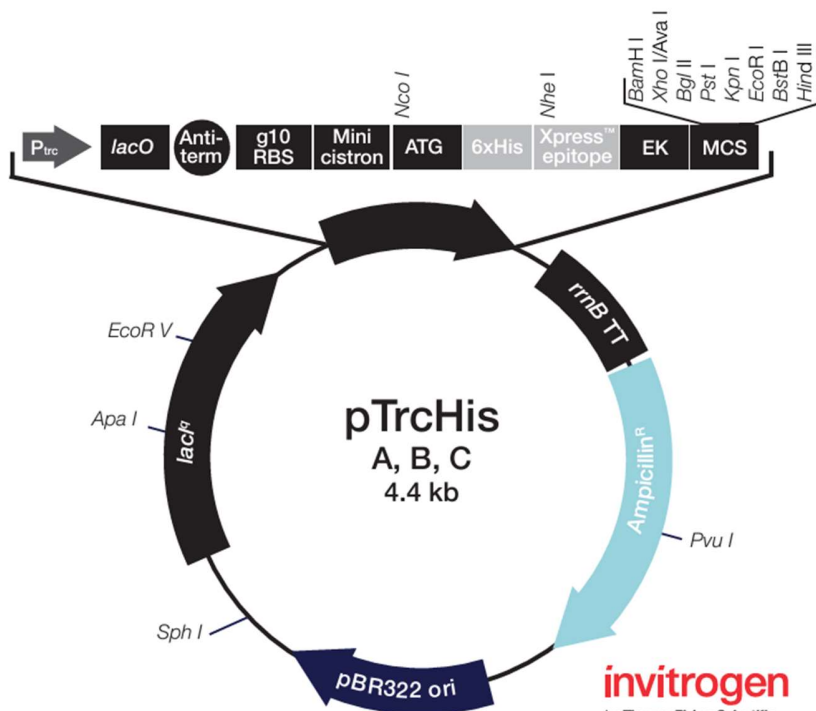
ce type de structure cellulaire ainsi que son utilisation croissante en tant que modèle pour des applications de recherche, l'amélioration des techniques pour sa cryoconservation est d'un grand intérêt. C'est dans ce but que cette étude a réalisé des tests en utilisant des protéines cryoactives du blé pour estimer leur effet sur la viabilité de ce système multicellulaire lors de sa cryoconservation. Les résultats obtenus mettent de l'avant la difficulté de cryoconserver une structure entière présentant le degré de complexité d'un organoïde. Certaines protéines de blé utilisées (TaENO, WCS120, TaBAS1) ont montré des effets similaires sur la survie des organoïdes congelés en présence de solutions commerciales prévues à cet effet. Cette survie est néanmoins relativement basse et contribue à mettre de l'avant le besoin de développer une méthode efficace permettant de cryoconserver les organoïdes sans besoin de remise en culture/redifférenciation après dégel. Ce travail décrit les limites associées à la congélation et à l'évaluation de la viabilité d'organoïdes entiers, dont la structure reste intacte, et propose des solutions pour surmonter ces défis. La difficulté d'obtenir des conclusions sur la viabilité des organoïdes après les cryoessais réalisés encourage néanmoins l'utilisation de méthodes d'estimation de la viabilité sur des cellules simples dérivées de la perturbation de la structure des organoïdes, ce qui pourrait également permettre une quantification plus précise des observations. Des tests sur des organoïdes partiels sont proposés comme amélioration des tests préliminaires, pouvant également mener à une évaluation fonctionnelle après leur cryoconservation.

ANNEXE A

Carte du vecteur d'expression pTrcHis

Comments for pTrcHis B 4404 base pairs

trc promoter: bases 191-221
lac operator: bases 228-248
rrnB anti-termination sequence: bases 264-333
 T7 gene 10 translational enhancer: bases 346-354
 Ribosome binding site: bases 370-374
 Mini cistron: bases 383-409
 6xHis tag and enterokinase cleavage site: bases 425-504
 Xpress™ epitope: bases 482-505
 Multiple cloning site: bases 515-554
rrnB transcriptional termination sequence: bases 637-794
 Ampicillin resistance (*bla*) gene ORF: bases 1074-1934
 pBR322 origin: bases 2079-2752
lacI^R ORF: bases 3281-4365



For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

ANNEXE B

Séquence de l'énolase TaENO de blé

- Séquence codant pour TaENO-FL

ATGGCCGCCACGATCCAGTCCGTGGAGGCCCGCCAGATCTTCGACAGCCGCGGCAACCCACCGTCGAGGT
TGATGTGTGCTGCTCAGATGGAACCTTCGCCAGGGCCGCTGTTCCAGCGGTGCATCAACTGGTGTCTATG
AAGCTTTGGAGCTGAGGGACGGTGGATCTGACTACTTGGGCAAGGGTGTTTCCAAGGCTGTAAACAATGTG
AACTCCATTATTGCACCTGCTTTGGTCCGCAAGGACCCTACCGCTCAAACCTGAGCTCGACAACCTTTATGGT
TCGGCAGCTTGATGGAACCAAGAATGAGTGGGGTTGGTGAAGCAAAAGCTTGGTGCTAATGCAATCCTGG
CTGTGTCACTAGCTGTTTGCAAAGCTGGAGCCAGCGTCAAGAAGATTCCACTGTACCAGCACATTGCCAAC
CTTGCTGGCAACAAGCAATTGGTTTTGCCTGTTCCCGCATTCAATGTCATCAATGGTGGATCCCATGCTGG
AAACAAGCTTGCCATGCAGGAGTTCATGATCCTTCCACTGGAGCTGCCTCATTCAAGGAGGCAATGAAGA
TGGGTGTTGAGGTGTACCACAACCTGAAGTCTGTTATCAAGAAGAAGTATGGCCAGGATGCCACCAATGTT
GGAGATGAAGGTGGTTTTGCTCCTAACATTCAGGAGAACAAGGAGGGCCTTGAGCTCTTGAAGACCGCAAT
TGAGAAGGCTGGATACACCGGCAAGGTTGTCATTGGAATGGATGTTGCTGCTTCAGAGTTCTACAATGACA
AGGACAAAACCTATGACCTCAACTTCAAGGAAGAGAACAACGATGGTTCCCAGAAGATATCTGGAGATAGC
CTGAAGAACGTATACAAGTCATTCGTGAGCGAGTACCCATTGTGTGCGATTGAGGACCCATTTGACCAGGA
TGACTGGGTGCACTATGCCAAGATGACTGAGGAATGTGGAGTGAAGTTCAGATTGTTGGTGATGACCTTC
TAGTCACCAACCCAACTAGAGTTGCAAAGGCAATCCAGGAGAAGTCATGCAATGCTCTTCTGCTGAAGGTT
AACCAAATTGGATCCGTCCTGAGAGTATCGAGGCCGTGAAGATGTCAAACACGCTGGCTGGGGTGTTCAT
GACCAGCCACAGGAGTGGTGGAGCCGAGGACACATTCATTGCTGATTTGGCTGTTGGTTTTGTCCACGGGTC
AGATTAAGACCGGGGCTCCCTGTGCTCGGAGCGTCTGCCAAGTACAACCAGCTTCTGAGGATCGAGGAG
GAGCTGGGCGATGCCGCTGTGTACGCCGGCCTCAAGTTCGCGCACCGGTGGAGCCATACTAG

Séquence obtenue à l'aide des résultats de séquençage effectués dans un vecteur (pTrcHisB) contenant l'insert codant pour la version de TaENO (complète) utilisée dans les travaux. Cette séquence obtient un alignement correspondant à 97,32% au gène codant pour TaENO-b (KC342470 GenBank) et 96,35% TaENO-a (KC342469).

- Séquences en acides aminés de la protéine TaENO-FL

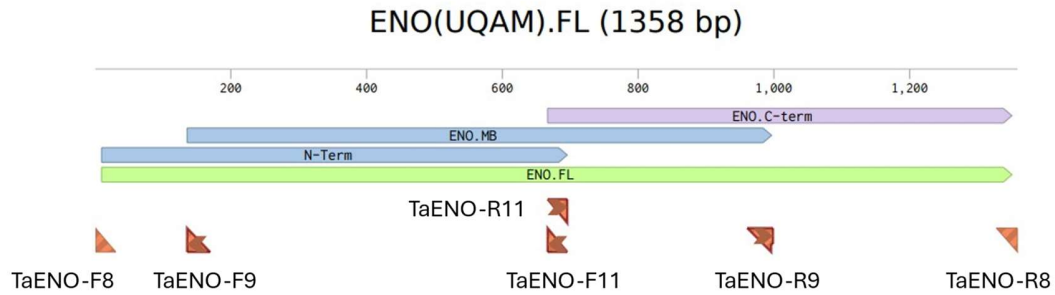
MAATIQSVEARQIFDSRGNPTVEVDVCCSDGTFARAAPVSGASTGVYEALELRDGGSDYLGKGVSKAVNNVNSIIAPAL
VGKDPTAQTELDNFMVRQLDGTKNEWGWCKQKLGANAILAVSLAVCKAGASVKKIPLYQHIANLAGNKQLVLPVPF
NVINGGSHAGNKLAMQEFMILPTGAASFKEAMKMGVEVYHNLKSVIKKYGQDATNVGDEGGFAPNIQENKEGLELL
KTAIEKAGYTGKVVIGMDVAASEFYNDKDKTYDLNFKEENNDGSQKISGDSLKNVYKSFVSEYPIVSIEDPFDQDDWVHY

AKMTEECGVEVQIVGDDLLVTNPTRVAKAIQEKSCNALLKVNQIGSVTESIEAVKMSKHAGWGVMTSHRSGETEDTFI
ADLAVGLSTGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEEEELGDAAVYAGLKFRAPVE

Séquence peptidique obtenue à l'aide de la plateforme Benchling à partir de la séquence codante de
TaENO-FL

ANNEXE C

Amorces utilisées pour la génération des fragments de l'énolase TaENO



Amorce	Séquence	Utilisé pour
TaENO-F8	CACTCGAGGATGGCCGCCACGATCC	ENO-FL, ENO-Nterm
TaENO-F9	CACTCGAGGTCAACTGGTGTATTATG	ENO-MR
TaENO-R11	CAGAATCCCCTCCTTGTTCTCCCGAATGTTAGGAGC	ENO-Nterm
TaENO-F11	CACTCGAGCGCTCCTAACATTCTGGG	ENO-Cterm
TaENO-R9	CAGAATTCATCACCAACAATCTGAA	ENO-MR
TaENO-R8	CAGAATTCCTAGTATGGCTCCACCG	ENO-FL, ENO-Cterm

ANNEXE D

Propriétés prédites pour les fragments de l'énolase TaENO

A Properties		B Properties	
Position	413-1858 (forward)	Position	413-1201 (forward)
Summary	MGGS...VEPY* 482 AAs	Summary	MGGS...VEPY* 263 AAs
Molecular weight	52032.41 Da	Molecular weight	28935.10 Da
Isoelectric point (pI)	5.48	Isoelectric point (pI)	5.01
Extinction coefficient		Extinction coefficient	
Cys fully reduced	44350.00 M ⁻¹ cm ⁻¹	Cys fully reduced	25900.00 M ⁻¹ cm ⁻¹
Abs 0.1% (1 g/l)	0.852	Abs 0.1% (1 g/l)	0.895
Cys fully oxidized	44725.00 M ⁻¹ cm ⁻¹	Cys fully oxidized	26025.00 M ⁻¹ cm ⁻¹
Abs 0.1% (1 g/l)	0.860	Abs 0.1% (1 g/l)	0.899
Instability Index	38.73 (stable)	Instability Index	47.89 (unstable)

C Properties		D Properties	
Position	413-1438 (forward)	Position	413-1234 (forward)
Summary	MGGS...PDTD* 342 AAs	Summary	MGGS...CFGG* 274 AAs
Molecular weight	37565.99 Da	Molecular weight	28990.63 Da
Isoelectric point (pI)	5.13	Isoelectric point (pI)	6.75
Extinction coefficient		Extinction coefficient	
Cys fully reduced	45380.00 M ⁻¹ cm ⁻¹	Cys fully reduced	19940.00 M ⁻¹ cm ⁻¹
Abs 0.1% (1 g/l)	1.208	Abs 0.1% (1 g/l)	0.688
Cys fully oxidized	45505.00 M ⁻¹ cm ⁻¹	Cys fully oxidized	20190.00 M ⁻¹ cm ⁻¹
Abs 0.1% (1 g/l)	1.211	Abs 0.1% (1 g/l)	0.697
Instability Index	35.91 (stable)	Instability Index	31.06 (stable)

Propriétés prédites sur la plateforme Benchling des protéines modélisées à partir de l'ADNc de la protéine TaENO. A. TaENO-FL produit dans pTrcHisB (avec tag 6X-His) B. TaENO.C-Term dans pTrcHisB (avec tag 6X-His) C. TaENO.MR dans pTrcHisB (avec tag 6X-His) D. TaENO.N-Term dans pTrcHisB (avec tag 6X-His)

ANNEXE E

CUBIC *Tissus Clearing Protocol* – Protocole de transparisation CUBIC

CUBIC Tissue Clearing Protocol

Materials and Reagents

Urea: Fisher Bioreagents, Cat# BP169-500

N, N, N', N'-tetrakis (2-hydroxypropyl) ethylenediamine: Sigma-Aldrich, Cat# 122262-1L
polyethylene glycol mono-p-isooctylphenyl ether/Triton X-100: MP, Cat# 194854

Sucrose: Sigma-Aldrich, Cat# S7903-1KG

Triethanolamine (2,2',2''-nitrilotriethanol): Sigma, Cat# 90279-500ML

CUBIC-Reagent I (Up to 1 month shelf live)

25 wt% Urea
25 wt% N,N,N',N'-tetrakis (2-hydroxypropyl) ethylenediamine
15 wt% Triton X-100

Note: N, N, N', N'-tetrakis(2-hydroxypropyl) ethylenediamine is dense, warm up to 40-50 degrees before use to make it more liquid.

CUBIC-Reagent II (Up to 1 month shelf live)

50 wt% Sucrose
25wt% Urea
10 wt% Triethanolamine
0.1% (v/v) Triton X-100

Carrier Solution

1 X PBS
0.3 % Triton X-100
0.5 % BSA
1 % Goat Serum
0.05 % Sodium Azide (when necessary)

Whole Brain Clearing

1. Perfuse mouse transcardially with 4% PFA/PBS, post-fix dissected mouse brain 16-24 hrs at 4 degree
2. Wash post-fixed mouse brain with PBS 3 times with gentle shaking, 1 hr each time
3. Immerse mouse brain in 10 ml CUBIC-Reagent I at 37degree with gentle shaking for 28 days, change CUBIC-Reagent I every 3 days
4. Wash mouse brain with PBS 3 times at room temperature, >2 hrs each time while gently shaking
5. Immerse mouse brain in CUBIC-Reagent II for 7 days, change CUBIC-Reagent II every 2 days
6. Cleared brain can be kept in CUBIC-Reagent II at room temperature

300 μ m Brain Sections CUBIC Clearing with Staining

1. Fix 300 μ m Brain Sections in 4%PFA/PBS at 4 degree 16-18 hrs
2. Wash sections with PBS 3 times with gentle shaking, 1 hr each time
3. Immerse sections in CUBIC-Reagent I at room temperature with gentle shaking for 3 days, change CUBIC-Reagent I every day
4. Wash sections with PBS 3 times at room temperature, 2 hrs each time while gently shaking
5. Immerse sections in carrier solution >3h at room temperature while gently shaking
6. Immerse sections in primary antibodies diluted in carrier solution for 2-3 days at room temperature or 6-7 days at 4 degree with gentle shaking
7. Wash sections with PBS 3 times at room temperature, 2 hrs each time while gently shaking
8. Immerse sections in secondary antibodies + DAPI (600 nM) diluted in carrier solution for 2-3 days at room temperature or 6-7 days at 4 degree with gentle shaking
9. Wash sections with PBS 3 times at room temperature, >2 hrs or overnight each time while gently shaking (note: the longer the better)
10. Immerse sections in CUBIC-Reagent II at room temperature with gentle shaking for 1 day before imaging
11. Mount in 300 μ m imaging gaskets, load coverslips, imaging

Note: Replace PBS with PB (PH 7.6) when necessary
Incubating time in each step could be adjustable

Reference:

Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Yukinaga H, Kuno A, Ueda HR. Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging. Nat Protoc. 2015 Nov;10(11):1709-27.

Matsumoto K, Mitani TT, Horiguchi SA, Kaneshiro J, Murakami TC, Mano T, Fujishima H, Konno A, Watanabe TM, Hirai H, Ueda HR. Advanced CUBIC tissue clearing for whole-organ cell profiling. Nat Protoc. 2019 Dec;14(12):3506-3537.

ANNEXE F

3dGRO Organoid Freeze Medium – Fiche technique

3dGRO™ Organoid Freeze Medium

Stem Cell Media

Cat. # SCM301

FOR RESEARCH USE ONLY.
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.
NOT FOR HUMAN OR ANIMAL CONSUMPTION.

pack size: 50 ml

Store at -20°C



Data Sheet

page 1 of 2

Background

Organoids are *in-vitro* derived 3D cell aggregates derived from primary tissue or stem cells that are capable of self-renewal, self-organization and exhibit organ functionality. Organoids address the limitations of existing 2D model systems by providing:

- **Similar composition and architecture to primary tissue:** Organoids harbor small population of self-renewing stem cells (such as intestinal crypt stem cells) that can differentiate into cells of all major cell lineages, with similar frequency as in physiological condition.
- **Relevant models of *in-vivo* conditions:** Organoids are more biologically relevant to any model system and are amenable to manipulate niche components and gene sequence.
- **Stable system for extended cultivation:** Organoids can be cryopreserved as biobanks and expanded indefinitely by leveraging self-renewal, differentiation capability of stem cell and intrinsic ability to self-organize.

Organoids can be cryopreserved using standard cell freezing techniques however freeze/thaw viability remains a challenge. The 3dGRO™ Organoid Freeze Medium is a proprietary optimized cryopreservation media for multiple organoids cell types. The media supports higher freeze/thaw viabilities compared to other commercial or homemade organoid freezing media formulations.

Storage

Aliquot and store the 3dGRO™ Organoid Freeze Medium at -20°C. Thaw at room temperature or 2-8°C overnight. Avoid multiple freeze thaw cycles

Quality Control

Appearance (color): Amber

Osmolality: 250-350 mOsm

pH: 6.8-7.1

Sterility Tested: No Growth/Pass

Bacterial & Fungal Tested: Passed

Cryopreservation Protocol

Freeze ≥ 200 organoids per cryovial when organoids are mature and look like they are ready to be passaged. The following protocol is based on freezing one cryovial.

1. Prepare all media and reagents required before the experiment. Thaw 3dGRO™ Organoid Freeze Medium on ice.
2. Count the number of organoids that are present in a dome. Combine multiple wells if one dome contains less than 200 organoids.
3. Aspirate the culture medium. Add 1 mL PBS to each well. Using a p1000 pipet, pipet up and down 10 times to break up the organoid dome into smaller pieces. Transfer the dissociated organoid mixture, combining domes if necessary, to a 50 mL conical tube.
4. Rinse the wells with 0.5 mL PBS and combine the supernatant to the conical tube. Centrifuge at 500-650x g for five minutes at 4°C.
5. Carefully aspirate the supernatant and leave around 100 μ L medium behind. **Note:** Do not aspirate all the way down to the pellet as you may inadvertently aspirate the smaller organoids.
6. Add 10 mL DMEM/F-12 or DMEM medium to wash the pellet. Gently pipette up and down once. Centrifuge the suspension at 650 - 700x g for five minutes at 4°C.
7. Carefully aspirate the supernatant and leave around 50-100 μ L medium behind. Using a 20 μ L pipette tip, carefully remove the remaining medium.
8. Resuspend the organoid pellet in a suitable amount of ice-cold (2 - 8°C) 3dGRO™ Organoid Freeze Medium. Avoid over-pipetting. Do not dissociate the pellet to single cells. **Note:** Each cryovial should contain at least 200 organoids.
9. Aliquot 1 mL into labeled cryovials. Place the cryovial(s) in a Mr. Frosty container with isopropyl alcohol.
10. Transfer the freezing container to a -80°C freezer; 24hrs later, transfer the cryovial to liquid nitrogen (-135°C) for long term storage. Long-term storage at -80°C is not recommended.

Please visit www.millipore.com for additional product information and references.

Submit your published journal article, and earn credit toward future purchases. Visit www.millipore.com/publicationrewards to learn more!

Rev 1.0/2019-05-14/SCM301/UK

3dGRO™ Organoid Freeze Medium
Cat # SCM301

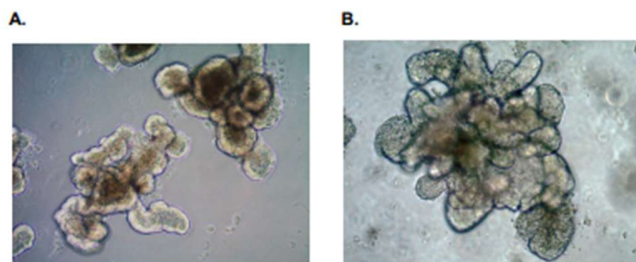


Figure 1. The 3dGRO™ Organoid Freeze Medium supports high freeze/thaw cell viabilities of multiple cell types including mouse intestinal organoids (A) and human iPSC derived colon organoids (B). Images represent day 10 post freeze/thaw in optimized organoid expansion media.

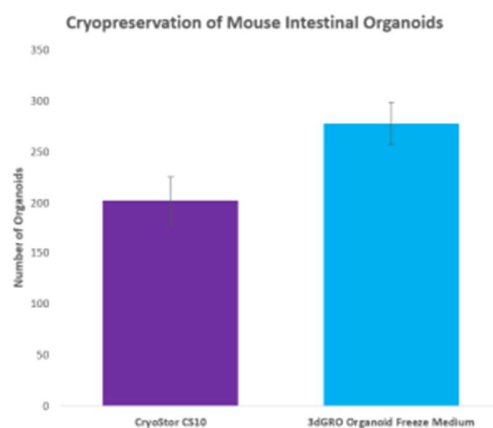


Figure 2. Mouse intestinal organoids cryopreserved in 3dGRO™ Organoid Freeze Medium produce a higher number of viable organoids post freeze/thaw vs. CryoStor CS10.

Related Products

Product Description	Catalog Number
3dGRO™ Human iPSC Derived Colon Organoids	SCC300
3dGRO™ Human Colon Organoid Expansion Medium	SCM304
3dGRO™ R-Spondin-1 Conditioned Media Supplement, 10 mL	SCM104
3dGRO™ Organoid Freeze Medium	SCM301
Definitive Endoderm Induction Medium	SCM302
Hindgut Endoderm Induction Medium	SCM303
DMEM/F-12 PLUS Basal Medium, 500 ml	SCM162

3dGRO™ is a trademark of Merck KGaA, Darmstadt, Germany

antibodies Multiplex products biotools cell culture enzymes kits proteins/peptides siRNA/cDNA products

Please visit www.millipore.com for additional product information, test data and references

EMD Millipore Corporation, 28820 Single Oak Drive, Temecula, CA 92590, USA 1-800-437-7500

Technical Support: T: 1-800-MILLIPORE (1-800-645-5476) • F: 1-800-437-7502

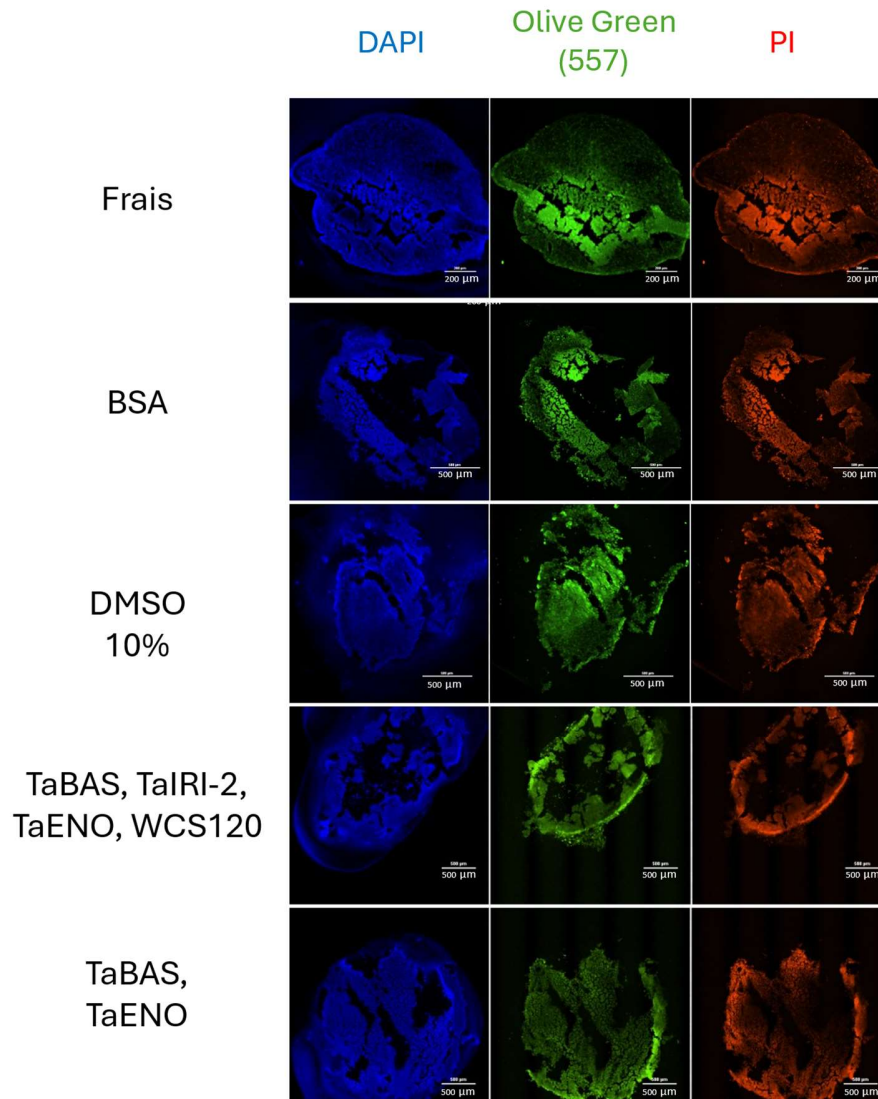
FOR RESEARCH USE ONLY. Not for use in diagnostic procedures. Not for human or animal consumption. Purchase of this Product does not include any right to resell or transfer, either as a stand-alone product or as a component of another product. Any use of this Product for purposes other than research is strictly prohibited.
EMD Millipore®, the M mark, Upstate®, Chemicon®, Linco® and all other registered trademarks, unless specifically identified above in the text as belonging to a third party, are owned by Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Copyright ©2008-2019 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.



100% Certified Renewable Energy

ANNEXE G

Images supplémentaires d'organoïdes cérébraux



Les photos ont été obtenues par observation au microscope confocal à fluorescence (objectif 10X à air) sur des coupes histologiques d'organoïdes de cerveau marqués avec deux sondes permettant d'estimer la viabilité cellulaire (OliveGreen557/PI) puis fixées en vue de leur coupe avec un microtome à cryostat. Le milieu de congélation de chaque condition est indiqué à gauche, la quantité des protéines utilisées équivaut à 1 mg/mL au total dans les tests. L'échelle est indiquée dans le coin droit en bas de chaque image. Les images présentent des coupes effectuées vers le centre de la structure afin d'obtenir un signal représentatif de l'ensemble de la structure. Le DAPI est appliqué aux coupes puis lavé pour mise en évidence de la structure observée. Les images ont été traitées à l'aide du logiciel NisElementViewer. Les images représentent respectivement de la gauche vers la droite : le signal obtenu pour la fluorescence du DAPI, le signal obtenu pour la fluorescence de la sonde OliveGreen557 et le signal obtenu pour la fluorescence du PI.

RÉFÉRENCES

- Aigha II et Abdelalim EM (2020) NKX6.1 transcription factor: a crucial regulator of pancreatic β cell development, identity, and proliferation. *Stem Cell Research & Therapy* 11: 459.
- Albanese A, Swaney JM, Yun DH, Evans NB, Antonucci JM, Velasco S, Sohn CH, Arlotta P, Gehrke L et Chung K (2020) Multiscale 3D phenotyping of human cerebral organoids. *Scientific Reports* 10: 21487.
- Aliakbari F, Sedighi Gilani MA, Yazdekhesti H, Koruji M, Asgari HR, Baazm M, Izadyar F, Kharrazi Nejad E, Khanezad M et Abbasi M (2017) Effects of antioxidants, catalase and α -tocopherol on cell viability and oxidative stress variables in frozen-thawed mice spermatogonial stem cells. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 45: 63-68.
- Alur MD et Grecz N (1975) Mechanism of injury of *Escherichia coli* by freezing and thawing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 62: 308-312.
- Averill-Bates D, Grondin M, Chow-shi-yée M et Ouellet F (2016) Plant proteins as efficient cryoprotectants for mammalian cells. *Cryobiology* 73: 420.
- Awan M, Buriak I, Fleck R, Fuller B, Goltsev A, Kerby J, Lowdell M, Mericka P, Petrenko A, Petrenko Y, et al. (2020) Dimethyl sulfoxide: A central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regenerative Medicine* 15: 1463-1491.
- Baboo J, Kilbride P, Delahaye M, Milne S, Fonseca F, Blanco M, Meneghel J, Nancekievill A, Gaddum N et Morris GJ (2019) The impact of varying cooling and thawing rates on the quality of cryopreserved human peripheral blood T cells. *Scientific Reports* 9: 3417.
- Baeshen NA, Baeshen MN, Sheikh A, Bora RS, Ahmed MM, Ramadan HA, Saini KS et Redwan EM (2014) Cell factories for insulin production. *Microbial Cell Factories* 13: 141.
- Bahari L, Bein A, Yashunsky V et Braslavsky I (2018) Directional freezing for the cryopreservation of adherent mammalian cells on a substrate. *PLoS One* 13: e0192265.
- Bajpayee M, Kumar A et Dhawan A (2016) The Comet Assay: A versatile tool for assessing DNA damage. Dans *The Comet Assay in Toxicology*. Anderson D et Dhawan A, eds. The Royal Society of Chemistry.
- Benelli C (2021) Plant cryopreservation: A look at the present and the future. *Plants* 10: 2744.
- Berthold P et Helbig AJ (1992) The genetics of bird migration: stimulus, timing, and direction. *Ibis* 134: 35-40.
- Best BP (2015) Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation Research* 18: 422-436.
- Bissoyi A, Nayak B, Pramanik K et Sarangi S (2014) Targeting cryopreservation-induced cell death: A review. *Biopreservation and Biobanking* 12: 23-34.

- Blount ZD (2015) The unexhausted potential of *E. coli*. *eLife* 4: e05826.
- Bode KJ, Mueller S, Schweinlin M, Metzger M et Brunner T (2019) A fast and simple fluorometric method to detect cell death in 3D intestinal organoids. *BioTechniques* 67: 23-28.
- Bojic S, Murray A, Bentley BL, Spindler R, Pawlik P, Cordeiro JL, Bauer R et de Magalhaes JP (2021) Winter is coming: the future of cryopreservation. *BMC Biology* 19: 56.
- Boyle R et Merret C (1973) *New experiments and observations touching cold, or, An experimental history of cold, begun : to which are added an examen of antiperistasis, and an examen of Mr. Hobs's doctrine about cold. ... Whereunto is annexed An account of freezing, brought in to the Royal Society, by the learned Dr. C. Merret, a fellow of it.* Readex Microprint.
- Breckels LM, Gatto L, Christoforou A, Groen AJ, Lilley KS et Trotter MWB (2013) The effect of organelle discovery upon sub-cellular protein localisation. *Journal of Proteomics* 88: 129-140.
- Bredow M et Walker VK (2017) Ice-Binding Proteins in plants. *Frontiers in Plant Science* 8: 2153.
- Bronshteyn VL et Steponkus PL (1995) Nucleation and growth of ice crystals in concentrated solutions of ethylene glycol. *Cryobiology* 32: 1-22.
- Cabrita E, Anel L et Herraéz MP (2001) Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology* 56: 623-635.
- Calcott PH et MacLeod RA (1975) The survival of *Escherichia coli* from freeze–thaw damage: the relative importance of wall and membrane damage. *Canadian Journal of Microbiology* 21: 1960-1968.
- Carey HV, Andrews MT et Martin SL (2003) Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiological Reviews* 83: 1153-1181.
- Carthy CM, Granville DJ, Watson KA, Anderson DR, Wilson JE, Yang D, Hunt DWC et McManus BM (1998) Caspase activation and specific cleavage of substrates after coxsackievirus B3-induced cytopathic effect in HeLa cells. *Journal of Virology* 72: 7669-7675.
- Chang A, Kim Y, Hoehn R, Jernigan P et Pritts T (2017) Cryopreserved packed red blood cells in surgical patients: past, present, and future. *Blood Transfusion* 15: 341-347.
- Chen H, Zhang L, Meng L, Liang L et Zhang C (2022) Advantages of vitrification preservation in assisted reproduction and potential influences on imprinted genes. *Clinical Epigenetics* 14: 141.
- Chen J, Liu X, Hu Y, Chen X et Tan S (2023) Cryopreservation of tissues and organs: Present, bottlenecks, and future. *Frontiers in Veterinary Science* 10: 1201794.
- Chiu-Lam A, Staples E, Pepine CJ et Rinaldi C (2021) Perfusion, cryopreservation, and nanowarming of whole hearts using colloiddally stable magnetic cryopreservation agent solutions. *Science Advances* 7: eabe3005.
- Choi YJ, Morel L, Le François T, Bourque D, Bourget L, Groleau D, Massie B et Míguez CB (2010) Novel, versatile, and tightly regulated expression system for *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 76: 5058-5066.

- Chow-shi-yée M, Briard JG, Grondin M, Averill-Bates DA, Ben RN et Ouellet F (2016a) Inhibition of ice recrystallization and cryoprotective activity of wheat proteins in liver and pancreatic cells. *Protein Science* 25: 974-986.
- Chow-shi-yée M, Grondin M, Averill-Bates DA et Ouellet F (2016b) Plant protein 2-Cys peroxiredoxin TaBAS1 alleviates oxidative and nitrosative stresses incurred during cryopreservation of mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering* 113: 1511-1521.
- Chow-shi-yée M, Grondin M, Ouellet F et Averill-Bates DA (2020) Control of stress-induced apoptosis by freezing tolerance-associated wheat proteins during cryopreservation of rat hepatocytes. *Cell Stress and Chaperones* 25: 869-886.
- Costa EC, Silva DN, Moreira AF et Correia IJ (2019) Optical clearing methods: An overview of the techniques used for the imaging of 3D spheroids. *Biotechnology and Bioengineering* 116: 2742-2763.
- Costa P, Gomes ATPC, Braz M, Pereira C et Almeida A (2021) Application of the resazurin cell viability assay to monitor *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* inactivation mediated by phages. *Antibiotics* 10: 974.
- Costanzo J et Jr R (2011) Cryoprotectant production capacity of the freeze-tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. *Canadian Journal of Zoology* 71: 71-75.
- Dang L et Van Damme EJM (2015) Toxic proteins in plants. *Phytochemistry* 117: 51-64.
- De Paoli P (2005) Bio-banking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 897-910.
- Debruyne AC, Okkelman IA et Dmitriev RI (2023) Balance between the cell viability and death in 3D. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 144: 55-66.
- Dekkers JF, Rios AC, Ineveld RLv, Ariese HCR et Wehrens EJ (2020) Single-cell resolution three-dimensional imaging of intact organoids. *Journal of Visualized Experiments* e60709.
- Deng Y, Wang L, Chen Y et Long Y (2020) Optimization of staining with SYTO 9/propidium iodide: Interplay, kinetics and impact on *Brevibacillus brevis*. *BioTechniques* 69: 88-98.
- Ding Y, Shi Y et Yang S (2019) Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants. *New Phytologist* 222: 1690-1704.
- Dominijanni AJ, Devarasetty M, Forsythe SD, Votanopoulos KI et Soker S (2021) Cell viability assays in three-dimensional hydrogels: A comparative study of accuracy. *Tissue Engineering Part C: Methods* 27: 401-410.
- Dykes GA (2000) The effect of freezing on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 on beef trimmings. *Food Research International* 33: 387-392.
- Ebrahim N, Shakirova K et Dashinimaev E (2022) PDX1 is the cornerstone of pancreatic β -cell functions and identity. *Frontiers in Molecular Biosciences* 9: 1091757

- Ekpo MD, Xie J, Hu Y, Liu X, Liu F, Xiang J, Zhao R, Wang B et Tan S (2022) Antifreeze proteins: Novel applications and navigation towards their clinical application in cryobanking. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 2639.
- El Enshasy H, Abdeen M, Abdeen S, Elsayed E, el demellawy M, Shereef A et Elshereef A (2009) Serum Concentration effects on the kinetics and metabolism of HeLa-S3 cell growth and cell adaptability for successful proliferation in serum free medium. *World Applied Sciences Journal* 6: 608-615.
- Erol OD, Pervin B, Seker ME et Aerts-Kaya F (2021) Effects of storage media, supplements and cryopreservation methods on quality of stem cells. *World Journal of Stem Cells* 13: 1197-1214.
- Fitzgerald HC, Dhakal P, Behura SK, Schust DJ et Spencer TE (2019) Self-renewing endometrial epithelial organoids of the human uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116: 23132-23142.
- Fowler DB (2008) Cold acclimation threshold induction temperatures in cereals. *Crop Science* 48: 1147-1154.
- Fuchs Weizman N, Baram S, Montbriand J et Librach C (2021) Planned oocyte cryopreservation (Planned OC): systematic review and meta-analysis of cost-efficiency and patients' perspective. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 128: 950-962.
- Furtauer L, Weizmann J, Weckwerth W et Nagele T (2019) Dynamics of plant metabolism during cold acclimation. *International Journal of Molecular Science* 20: 5411.
- Gilfanova R, Callegari A, Childs A, Yang G, Luarca M, Gutierrez AG, Medina KI, Mai J, Hui A, Kline M, et al. (2021) A bioinspired and chemically defined alternative to dimethyl sulfoxide for the cryopreservation of human hematopoietic stem cells. *Bone Marrow Transplant* 56: 2644-2650.
- Gonzalez-Martinez N et Gibson MI (2023) Post-thaw application of ROCK-inhibitors increases cryopreserved T-cell yield. *RSC Medicinal Chemistry* 14: 2058-2067.
- Goodsell DS (2009) *Escherichia coli*. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 37: 325-332.
- Griffith M, Lumb C, Wiseman SB, Wisniewski M, Johnson RW et Marangoni AG (2005) Antifreeze proteins modify the freezing process *in planta* *Plant Physiology* 138: 330-340.
- Grondin M, Chow-shi-yée M, Ouellet F et Averill-Bates DA (2015) Wheat enolase demonstrates potential as a non-toxic cryopreservation agent for liver and pancreatic cells. *Biotechnology Journal* 10: 801-810.
- Grondin M, Hamel F, Averill-Bates DA et Sarhan F (2009) Wheat proteins improve cryopreservation of rat hepatocytes. *Biotechnol Bioeng* 103: 582-591.
- Grondin M, Robinson I, Do Carmo S, Ali-Benali MA, Ouellet F, Mounier C, Sarhan F et Averill-Bates DA (2013) Cryopreservation of insulin-secreting INS832/13 cells using a wheat protein formulation. *Cryobiology* 66: 136-143.

- Hamel F, Grondin M, Denizeau F, Averill-Bates DA et Sarhan F (2006) Wheat extracts as an efficient cryoprotective agent for primary cultures of rat hepatocytes. *Biotechnology and Bioengineering* 95: 661-670.
- Hasan M, Fayter AER et Gibson MI (2018) Ice recrystallization inhibiting polymers enable glycerol-free cryopreservation of microorganisms. *Biomacromolecules* 19: 3371-3376.
- Hassan MA, Xiang C, Farooq M, Muhammad N, Yan Z, Hui X, Yuanyuan K, Bruno AK, Lele Z et Jincai L (2021) Cold stress in wheat: Plant acclimation responses and management strategies. *Frontiers in Plant Science* 12: 676884.
- Hernández-Avilés C, Ramírez-Agámez L, Varner DD et Love CC (2023) Effects of egg yolk level, penetrating cryoprotectant, and pre-freeze cooling rate, on the post-thaw quality of stallion sperm. *Animal reproduction science* 248: 107162.
- Hohwieler M, Müller M, Frappart PO et Heller S (2019) Pancreatic progenitors and organoids as a prerequisite to model pancreatic diseases and cancer. *Stem Cells International* 2019: 9301382.
- Houde M, Daniel C, Lachapelle M, Allard F, Laliberte S et Sarhan F (1995) Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *The Plant Journal* 8: 583-593.
- Huang H, Bader TN et Jin S (2020) Signaling molecules regulating pancreatic endocrine development from pluripotent stem cell differentiation. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 5867.
- Hwarari D, Guan Y, Ahmad B, Movahedi A, Min T, Hao Z, Lu Y, Chen J et Yang L (2022) ICE-CBF-COR signaling cascade and its regulation in plants responding to cold stress. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 1549.
- Ignatov SG, Andreeva OV, Evdokimova OA, Artsatbanov V et Perelygin VV (1982) [Repair of membrane damage caused by low temperature freezing of *E. coli* cells]. *Biokhimiia* 47: 1621-1628.
- Ito A, Yoshioka K, Masumoto S, Sato K, Hatae Y, Nakai T, Yamazaki T, Takahashi M, Tanoue S et Horie M (2020) Magnetic heating of nanoparticles as a scalable cryopreservation technology for human induced pluripotent stem cells. *Scientific Reports* 10: 13605.
- Jazvinščak Jembrek M, Oršolić N, Mandić L, Sadžak A et Šegota S (2021) Anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of flavonols: Targeting Nrf2, NF-κB and p53 pathways in neurodegeneration. *Antioxidants (Basel)* 10: 1628.
- Jia Z et Davies PL (2002) Antifreeze proteins: an unusual receptor-ligand interaction. *Trends in Biochemical Sciences* 27: 101-106.
- Jin Y, Ding X, Li J et Guo Z (2022) Isolation and characterization of wheat ice recrystallisation inhibition gene promoter involved in low temperature and methyl jasmonate responses. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 28: 1969-1979.

- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Žídek A, Potapenko A, et al. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596: 583-589.
- Khaydukova IV, Ivannikova VM, Zhidkov DA, Belikov NV, Peshkova MA, Timashev PS, Tsiganov DI et Pushkarev AV (2024) Current state and challenges of tissue and organ cryopreservation in biobanking. *International Journal of Molecular Sciences* 25: 11124.
- Kim SJ, Park HW, Shin CH et Kim CW (2009) Establishment of a cryopreservation method for the industrial use of D-amino acid oxidase-overexpressing *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 73: 299-303.
- Kim HJ, Lee JH, Hur YB, Lee CW, Park S-H et Koo B-W (2017) Marine antifreeze proteins: Structure, function, and application to cryopreservation as a potential cryoprotectant. *Marine Drugs* 15: 27.
- Kolhe P, Amend E et K. Singh S (2010) Impact of freezing on pH of buffered solutions and consequences for monoclonal antibody aggregation. *Biotechnology Progress* 26: 727-733.
- Kumei Y, Nakajima T, Sato A, Kamata N et Enomoto S (1989) Reduction of G1 phase duration and enhancement of c-myc gene expression in HeLa cells at hypergravity. *Journal of cell science* 93 (Pt 2): 221-226.
- Lahtinen SJ, Ahokoski H, Reinikainen JP, Gueimonde M, Nurmi J, Ouwehand AC et Salminen SJ (2008) Degradation of 16S rRNA and attributes of viability of viable but nonculturable probiotic bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 46: 693-698.
- Lancaster MA, Renner M, Martin C-A, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, Homfray T, Penninger JM, Jackson AP et Knoblich JA (2013) Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501: 373-379.
- Landry JJ, Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stütz AM, Jauch A, Aiyar RS, Pau G, Delhomme N, et al. (2013) The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 3: 1213-1224.
- Len JS, Koh WSD et Tan SX (2019) The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. *Bioscience Reports* 39: BSR20191601
- Lewis JK, Bischof JC, Braslavsky I, Brockbank KGM, Fahy GM, Fuller BJ, Rabin Y, Tocchio A, Woods EJ, Wowk BG, et al. (2016) The grand challenges of organ banking: proceedings from the first global summit on complex tissue cryopreservation. *Cryobiology* 72: 169-182.
- Li S, Wang M et Zhou J (2020) Brain organoids: A promising living biobank resource for neuroscience research. *Biopreservation and Biobanking* 18: 136-143.
- Liu X, Xu Y, Liu F, Pan Y, Miao L, Zhu Q et Tan S (2021) The feasibility of antioxidants avoiding oxidative damages from reactive oxygen species in cryopreservation. *Frontiers in Chemistry* 9: 648684

- Lukonin I, Serra D, Challet Meylan L, Volkmann K, Baaten J, Zhao R, Meeusen S, Colman K, Maurer F, Stadler MB, et al. (2020) Phenotypic landscape of intestinal organoid regeneration. *Nature* 586: 275-280.
- Lyapun IN, Andryukov BG et Bynina MP (2019) HeLa cell culture: immortal heritage of Henrietta Lacks. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology* 34: 195-200.
- Marcantonini G, Bartolini D, Zatini L, Costa S, Passerini M, Rende M, Luca G, Basta G, Murdolo G, Calafiore R, et al. (2022) Natural cryoprotective and cytoprotective agents in cryopreservation: A focus on melatonin. *Molecules* 27: 3254.
- Mashouf P, Tabibzadeh N, Kuraoka S, Oishi H et Morizane R (2024) Cryopreservation of human kidney organoids. *Cellular and Molecular Life Sciences* 81: 306.
- Matsumoto K, Mitani TT, Horiguchi SA, Kaneshiro J, Murakami TC, Mano T, Fujishima H, Konno A, Watanabe TM, Hirai H, et al. (2019) Advanced CUBIC tissue clearing for whole-organ cell profiling. *Nature Protocols* 14: 3506-3537.
- Mayhew CN et Singhania R (2023) A review of protocols for brain organoids and applications for disease modeling. *STAR Protocols* 4: 101860.
- Méndez-Ardoy A, Lostalé-Seijo I et Montenegro J (2019) Where in the cell is our cargo? Methods currently used to study intracellular cytosolic localisation. *ChemBioChem* 20: 488-498.
- Mirabelli P, Coppola L et Salvatore M (2019) Cancer cell lines are useful model systems for medical research. *Cancers* 11: 1098.
- Mohamed N-V, Lépine P, Lacalle-Aurioles M, Sirois J, Mathur M, Reintsch W, Beitel LK, Fon EA et Durcan TM (2022) Microfabricated disk technology: Rapid scale up in midbrain organoid generation. *Methods* 203: 465-477.
- Mohamed N, Mathur M, da Silva R, Thomas R, Lepine P, Beitel L, Fon E et Durcan T (2021) Generation of human midbrain organoids from induced pluripotent stem cells [version 2; peer review: 3 approved, 1 approved with reservations]. *MNI Open Research* 3.
- Molbay M, Kolabas ZI, Todorov MI, Ohn TL et Ertürk A (2021) A guidebook for DISCO tissue clearing. *Molecular Systems Biology* 17: e9807.
- Muldrew K et McGann LE (1990) Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophysical Journal* 57: 525-532.
- Murray KA et Gibson MI (2022) Chemical approaches to cryopreservation. *Nature Reviews Chemistry* 6: 579-593.
- Naing AH et Kim CK (2019) A brief review of applications of antifreeze proteins in cryopreservation and metabolic genetic engineering. *3 Biotech* 9: 329.
- Nilsson J, Jonasson P, Samuelsson E, Ståhl S et Uhlén M (1996) Integrated production of human insulin and its C-peptide. *Journal of Biotechnology* 48: 241-250.

- Nott R (2020) HeLa cell line. *Embryo Project Encyclopedia*
- Olivier M, Hollstein M et Hainaut P (2010) TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: a001008.
- Onofre J, Baert Y, Faes K et Goossens E (2016) Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation. *Human Reproduction Update* 22: 744-761.
- Ouellet F et Charron J-B (2001) Cold acclimation and freezing tolerance in plants. Dans *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Ouellet F, Vazquez-Tello A et Sarhan F (1998) The wheat wcs120 promoter is cold-inducible in both monocotyledonous and dicotyledonous species. *FEBS Letters* 423: 324-328.
- Park SY et Kim CG (2018) A comparative study of three different viability tests for chemically or thermally inactivated *Escherichia coli*. *Environmental Engineering Research* 23: 282-287.
- Park Y-G, Sohn CH, Chen R, McCue M, Yun DH, Drummond GT, Ku T, Evans NB, Oak HC, Trieu W, et al. (2019) Protection of tissue physicochemical properties using polyfunctional crosslinkers. *Nature Biotechnology* 37: 73-83.
- Pegg DE (2002) The history and principles of cryopreservation. *Seminars in Reproductive Medicine* 20: 5-13.
- Pegg DE (2015) Principles of cryopreservation. Dans *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Wolkers WF et Oldenhof H, eds. Springer New York. New York, NY.
- Pereira E, Meneses A, Oliveira F et Penning L (2020) Principles of cryopreservation and applicabilities in intestinal organoids. *Japanese Journal of Gastroenterology and Hepatology* 04: 1-9.
- Peter K, Julie M, Mira Manilal C, Susan R et Tessa C (2022) Scaling up cryopreservation from cell suspensions to tissues: Challenges and successes. Dans *Cryopreservation*. Marian Q, ed. IntechOpen. Rijeka.
- Planas-Paz L et Pauli C (2021) Chapter 7 - Tissue biobanks. Dans *Principles of Translational Science in Medicine (Third Edition)*. Wehling M, ed. Academic Press. Boston.
- Polge C, Smith AU et Parkes AS (1949) Revival of *spermatozoa* after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666-666.
- Qian X, Song H et Ming G-l (2019) Brain organoids: advances, applications and challenges. *Development* 146: dev166074.
- Ramirez CN, Antczak C et Djaballah H (2010) Cell viability assessment: toward content-rich platforms. *Expert Opinion on Drug Discovery* 5: 223-233.
- Rawal S, Harrington S, Williams SJ, Ramachandran K et Stehno-Bittel L (2017) Long-term cryopreservation of reaggregated pancreatic islets resulting in successful transplantation in rats. *Cryobiology* 76: 41-50.

- Renner H, Grabos M, Becker KJ, Kagermeier TE, Wu J, Otto M, Peischard S, Zeuschner D, TsyTsyura Y, Disse P, et al. (2020) A fully automated high-throughput workflow for 3D-based chemical screening in human midbrain organoids. *eLife* 9: e52904.
- Reshes G, Vanounou S, Fishov I et Feingold M (2008) Timing the start of division in *E. coli*: a single-cell study. *Physical biology* 5: 046001.
- Riikonen T, Vihinen P, Potila M, Rettig W et Heino J (1995) Antibody against human $\alpha 1\beta 1$ integrin inhibits HeLa cell adhesion to laminin and to type I, IV, and V collagens. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 209: 205-212.
- Rodriguez-Gatica JE, Iefremova V, Sokhranyaeva L, Yeung SWCA, Breitzkreuz Y, Brüstle O, Schwarz MK et Kubitscheck U (2022) Imaging three-dimensional brain organoid architecture from meso- to nanoscale across development. *Development* 149:
- Rogulska O, Havelkova J et Petrenko Y (2023) Cryopreservation of organoids. *CryoLetters* 44: 65-75.
- Rosato MP et Iaffaldano N (2013) Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology* 79: 508-516.
- Rosenberg M, Azevedo NF et Ivask A (2019) Propidium iodide staining underestimates viability of adherent bacterial cells. *Scientific Reports* 9: 6483.
- Rubinsky B, Arav A et Devries AL (1992) The cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from antarctic fishes. *Cryobiology* 29: 69-79.
- Rubinsky B, Perez PA et Carlson ME (2005) The thermodynamic principles of isochoric cryopreservation. *Cryobiology* 50: 121-138.
- Santos LM, Cardoso PES, Diniz EA, Rahhal JG et Sipert CR (2023) Different concentrations of fetal bovine serum affect cytokine modulation in Lipopolysaccharide-activated apical papilla cells in vitro. *Journal of Applied Oral Science* 31: e20230020.
- Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J et Saldanha C (2003) Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology* 65: 1035-1041.
- Satyakam, Zinta G, Singh RK et Kumar R (2022) Cold adaptation strategies in plants-An emerging role of epigenetics and antifreeze proteins to engineer cold resilient plants. *Frontiers in Genetics* 13: 909007.
- Sharma P, Ganeshan S, Fowler DB et Chibbar RN (2013) Characterisation of two wheat enolase cDNA showing distinct patterns of expression in leaf and crown tissues of plants exposed to low temperature. *Annals of Applied Biology* 162: 271-283.

- Shen D, Coleman J, Chan E, Nicholson TP, Dai L, Sheppard PW et Patton WF (2011) Novel cell- and tissue-based assays for detecting misfolded and aggregated protein accumulation within aggresomes and inclusion bodies. *Cell Biochemistry and Biophysics* 60: 173-185.
- Shi L, Günther S, Hübschmann T, Wick LY, Harms H et Müller S (2007) Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. *Cytometry Part A* 71A: 592-598.
- Sievers F et Higgins DG (2018) Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Sci* 27: 135-145.
- Smagur A, Mitrus I, Giebel S, Sadus-Wojciechowska M, Najda J, Kruzel T, Czerw T, Gliwinska J, Prokop M, Glowala-Kosinska M, et al. (2013) Impact of different dimethyl sulphoxide concentrations on cell recovery, viability and clonogenic potential of cryopreserved peripheral blood hematopoietic stem and progenitor cells. *Vox Sanguinis* 104: 240-247.
- Smith AU (1970) Introduction Current Trends in Cryobiology. Dans *Current Trends in Cryobiology*. Smith AU, ed. Springer US. Boston, MA.
- Soleimani B, Lehnert H, Babben S, Keilwagen J, Koch M, Arana-Ceballos FA, Chesnokov Y, Pshenichnikova T, Schondelmaier J, Ordon F, et al. (2022) Genome wide association study of frost tolerance in wheat. *Scientific Reports* 12: 5275.
- Souzu H (1980) Studies on the damage to *Escherichia coli* cell membrane caused by different rates of freeze-thawing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 603: 13-26.
- Stiefel P, Schmidt-Emrich S, Maniura-Weber K et Ren Q (2015) Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiology* 15: 36.
- Sun N, Meng X, Liu Y, Song D, Jiang C et Cai J (2021) Applications of brain organoids in neurodevelopment and neurological diseases. *Journal of Biomedical Science* 28: 30.
- Taylor MJ, Weegman BP, Baicu SC et Giwa SE (2019) New approaches to cryopreservation of cells, tissues, and organs. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 46: 197-215.
- Tran R, Moraes C et Hoesli CA (2020) Developmentally-inspired biomimetic culture models to produce functional islet-like cells from pluripotent precursors. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8: 583970.
- Tremblay K, Ouellet F, Fournier J, Danyluk J et Sarhan F (2005) Molecular characterization and origin of novel bipartite cold-regulated ice recrystallization inhibition proteins from cereals. *Plant and Cell Physiology* 46: 884-891.
- Trinh KTL et Lee NY (2022) Recent methods for the viability assessment of bacterial pathogens: Advances, challenges, and future perspectives. *Pathogens* 11: 1057.
- Turner T (2012) Development of the polio vaccine: a historical perspective of Tuskegee University's role in mass production and distribution of HeLa cells. *Journal of Health Care for the Poor and Underserved* 23: 5-10.

- Tuttle AR, Trahan ND et Son MS (2021) Growth and maintenance of *Escherichia coli* laboratory strains. *Current Protocols 1*: e20.
- Ul-Haq S, Khan A, Ali M, Khattak AM, Gai WX, Zhang HX, Wei AM et Gong ZH (2019) Heat shock proteins: Dynamic biomolecules to counter plant biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Science 20*: 5321.
- Underhill MF et Smales CM (2007) The cold-shock response in mammalian cells: investigating the HeLa cell cold-shock proteome. *Cytotechnology 53*: 47-53.
- Walker VK, Palmer GR et Voordouw G (2006) Freeze-thaw tolerance and clues to the winter survival of a soil community. *Applied and Environmental Microbiology 72*: 1784-1792.
- Wang J, Wei Y, Zhao S, Zhou Y, He W, Zhang Y et Deng W (2017) The analysis of viability for mammalian cells treated at different temperatures and its application in cell shipment. *PLoS One 12*: e0176120.
- Wang L, Kong W, Wang F et Liu H (2019) Temperature-gradient effects on heterogeneous ice nucleation from supercooled water. *AIP Advances 9*: 125122.
- Whaley D, Damyar K, Witek RP, Mendoza A, Alexander M et Lakey JR (2021) Cryopreservation: An overview of principles and cell-specific considerations. *Cell Transplantation 30*: 963689721999617.
- Wisniewski M, Willick IR, Duman JG, Livingston D et Newton SS (2020) Plant antifreeze proteins. Dans *Antifreeze Proteins Volume 1: Environment, Systematics and Evolution*. Ramløv H et Friis DS, eds. Springer International Publishing. Cham.
- Xu X, Cowley S, Flaim CJ, James W, Seymour L et Cui Z (2010) The roles of apoptotic pathways in the low recovery rate after cryopreservation of dissociated human embryonic stem cells. *Biotechnol Prog 26*: 827-837.
- Xue W, Li H, Xu J, Yu X, Liu L, Liu H, Zhao R et Shao Z (2024) Effective cryopreservation of human brain tissue and neural organoids. *Cell Reports Methods 4*: 100777.
- Yakoub AM et Sadek M (2018) Development and characterization of human cerebral organoids: An optimized protocol. *Cell Transplantation 27*: 393-406.
- Yakoub AM et Sadek M (2019) Analysis of synapses in cerebral organoids. *Cell Transplantation 28*: 1173-1182.
- Yang S, Hu H, Kung H, Zou R, Dai Y, Hu Y, Wang T, Lv T, Yu J et Li F (2023) Organoids: The current status and biomedical applications. *MedComm (2020) 4*: e274.
- Zhan L, Rao JS, Sethia N, Slama MQ, Han Z, Tobolt D, Etheridge M, Peterson QP, Dutcher CS, Bischof JC, et al. (2022) Pancreatic islet cryopreservation by vitrification achieves high viability, function, recovery and clinical scalability for transplantation. *Nature Medicine 28*: 798-808.

Zhao Z, Chen X, Dowbaj AM, Sljukic A, Bratlie K, Lin L, Fong ELS, Balachander GM, Chen Z, Soragni A, et al. (2022) Organoids. *Nature Reviews Methods Primers* 2: 94.