

➤ **Projet ROSEpigs: bilan et perspectives**

Regulation Of Satiety and Epigenetic mechanisms in pigs

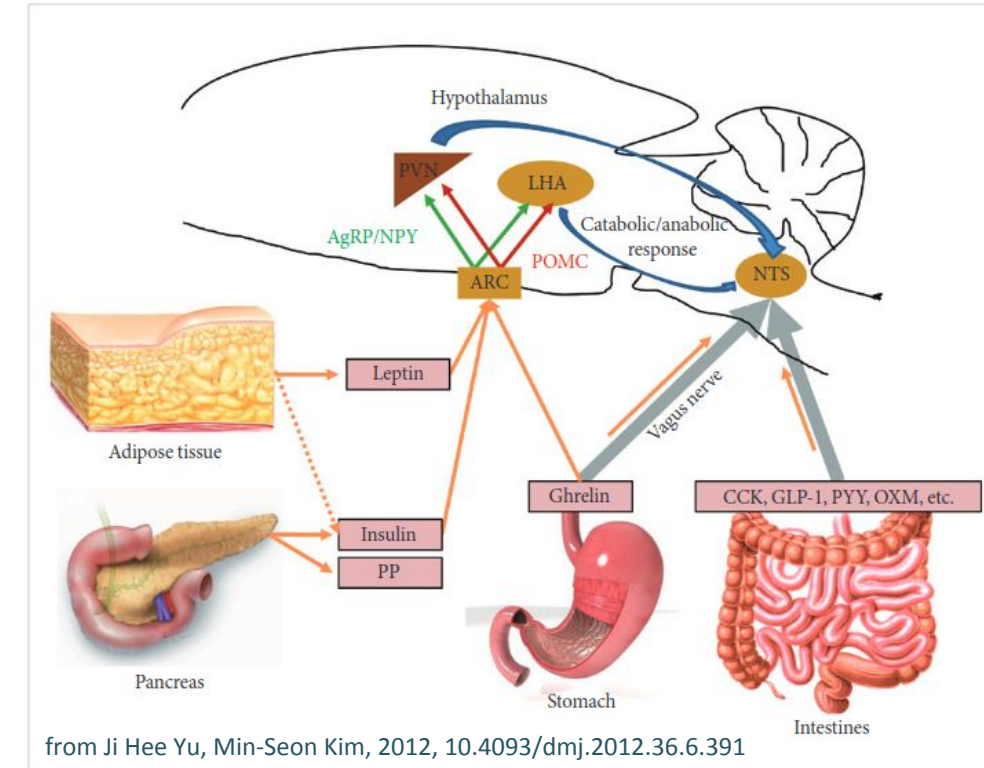
Transversalité porcine, 2020-11-05

Guillaume Devailly

Context - 2

La régulation de la satiété est impliqué dans de nombreuses thématiques d'intérêt

- Obésité
- Efficacité alimentaire
- Comportement alimentaires - données DAC
- Régulation thermique, adaptation à la chaleur
- Reproduction
- Alternatives au gavage



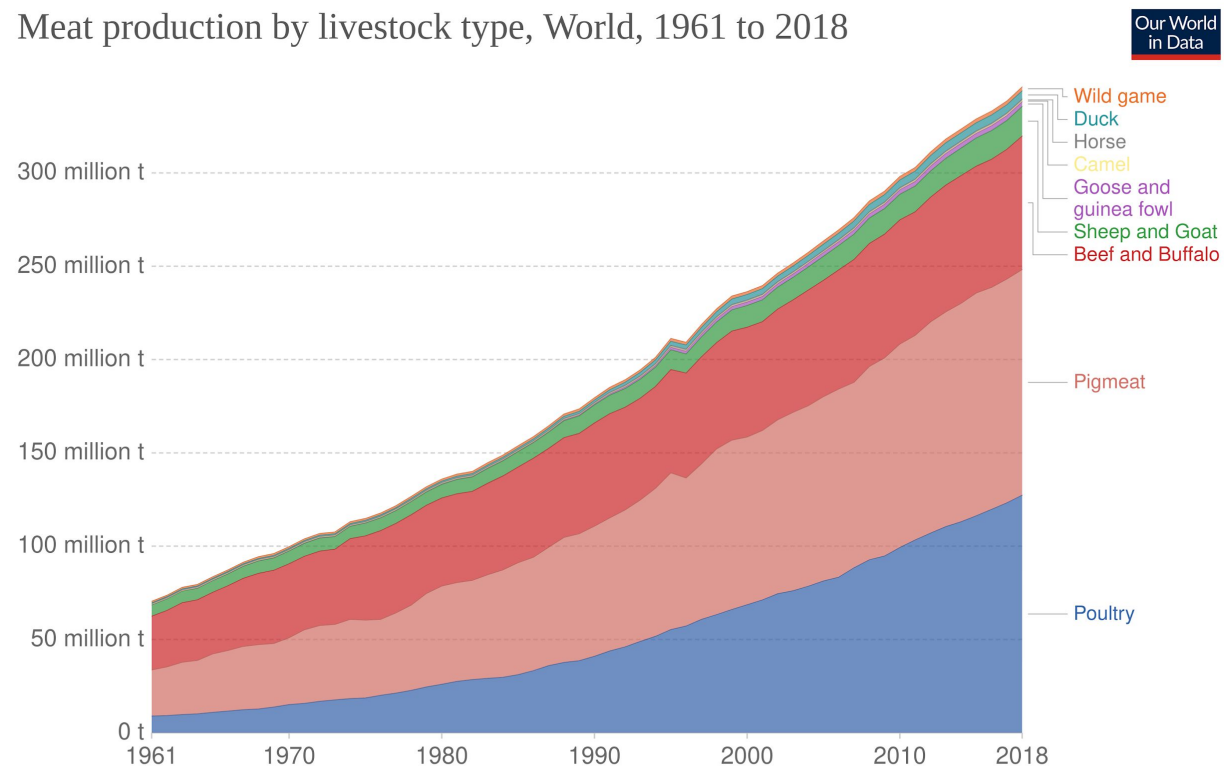
from Ji Hee Yu, Min-Seon Kim, 2012, 10.4093/dmj.2012.36.6.391

Fig. 2. A schematic representation of the multiple systems regulating appetite. AgRP, agouti-related peptide; ARC, arcuate nucleus; CCK, cholecystokinin; GLP-1, glucagon-like peptide 1; LHA, lateral hypothalamic area; NPY, neuropeptide Y; NTS, nucleus of the solitary tract; OXM, oxyntomodulin; POMC, pro-opiomelanocortin; PP, pancreatic polypeptide; PVN, paraventricular nucleus; PYY, peptide YY.

Contexte - 1

On mange beaucoup de viande de porc.

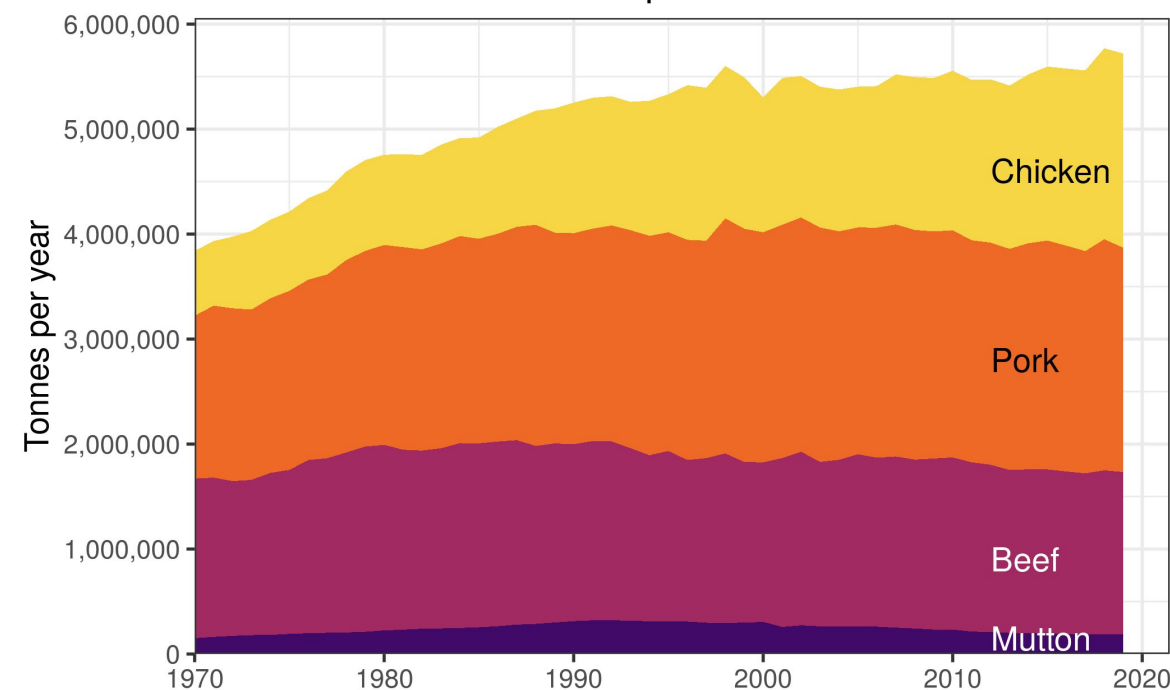
Meat production by livestock type, World, 1961 to 2018



Source: UN Food and Agricultural Organization (FAO)
Note: Total meat production includes both commercial and farm slaughter. Data are given in terms of dressed carcass weight, excluding offal and slaughter fats.

OurWorldInData.org/meat-production • CC BY

France total meat consumption



Data: FranceAgriMer, 2020-02-02



INRAE

Projet ROSEpigs

2020-11-05 / transversalité porcine / Guillaume Devailly

Introduction

ROSEpigs:

- Crédit incitatif GA 2019 (19 000€) + soutien de GenEpi / ModGen / GenPhySE (15 000 €)
- Objectif: Accumuler des connaissances et des compétences pour préparer un dépôt de projet ERC (mars 2021)
- Projet en deux parties :
 - mise en place de techniques d'**éditions de l'épigénome** sur lignées cellulaires intestinales de porcs
 - effet du passage du bol alimentaire sur le **transcriptome et le méthylome du duodénum** dans les lignée divergentes - efficacité alimentaire (G11)



Edition de l'épigénome

Technique d'édition de l'épigénome

Objectif : venir réprimer l'expression d'un gène en hyper-méthylant spécifiquement son promoteur.

Transfection transitoire:

- ARN guide
- dCas9-DNMT3A (gauche)
- ou dCas9-sunTag + GCN4-DNMT3A (droite)

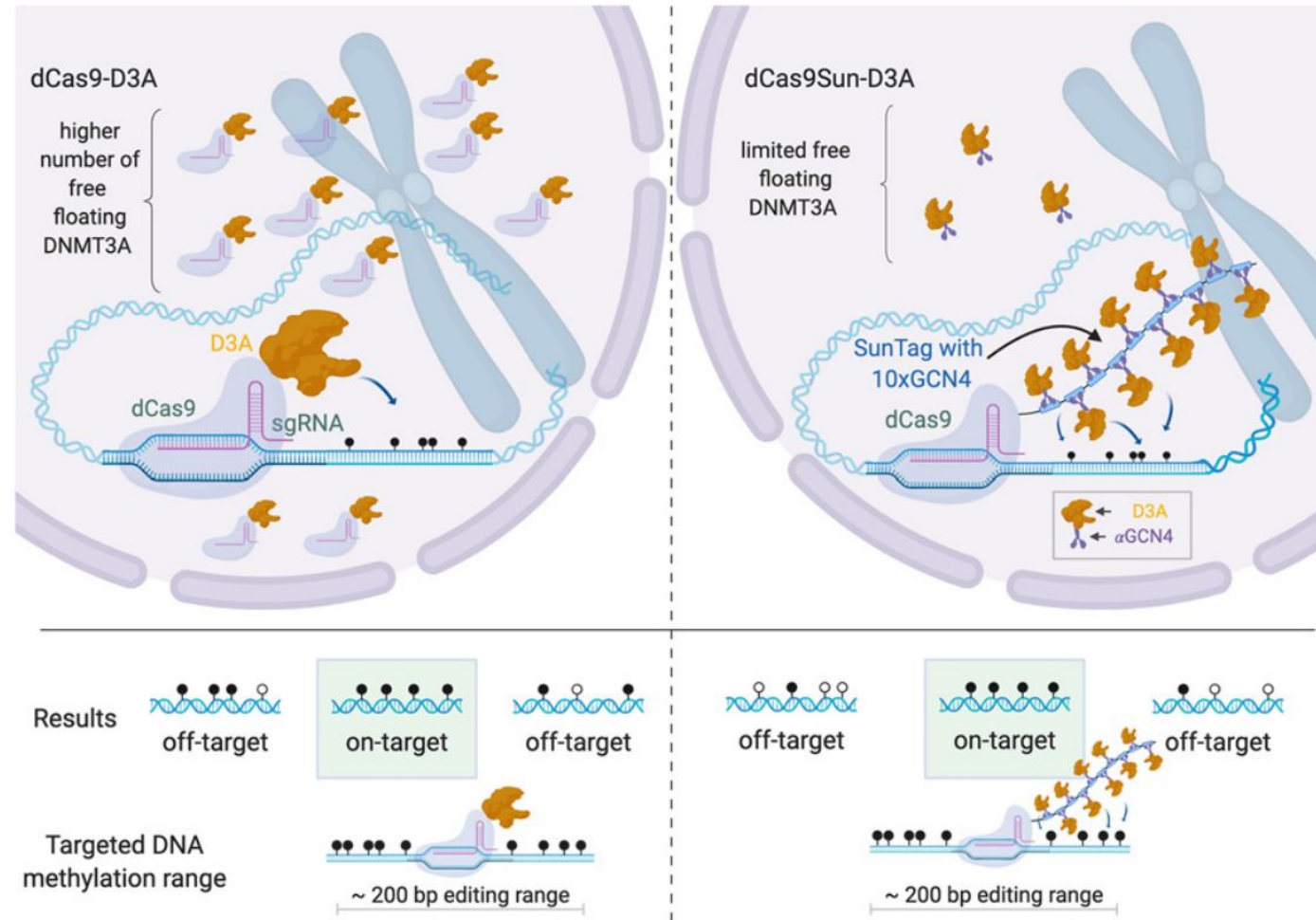


Figure 1. Overview of targeted DNA methylation editing technologies

Comparison of targeted DNA methylation editing by dCas9-based direct fusion and modular systems. Solid black circles and open circles represent 5-methylcytosine and unmethylated cytosine, respectively, in the CpG context. Figure created with BioRender.com

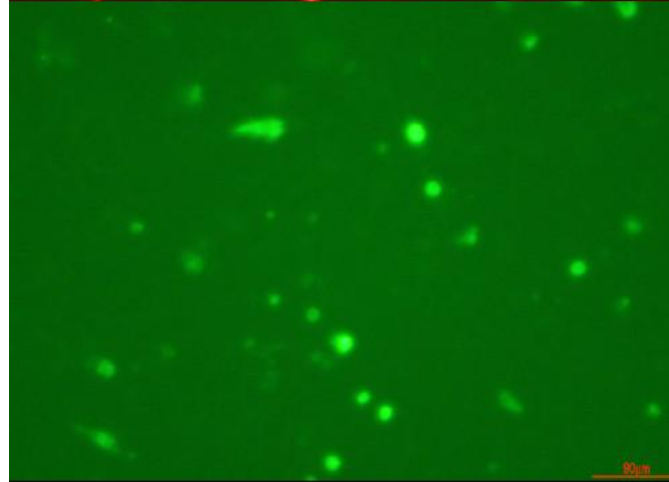
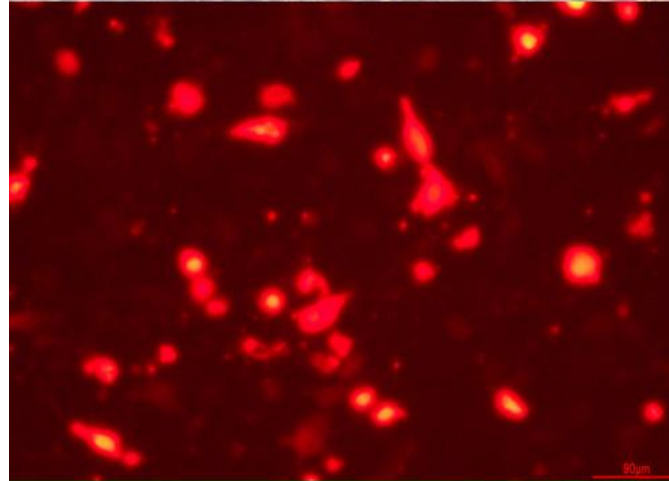
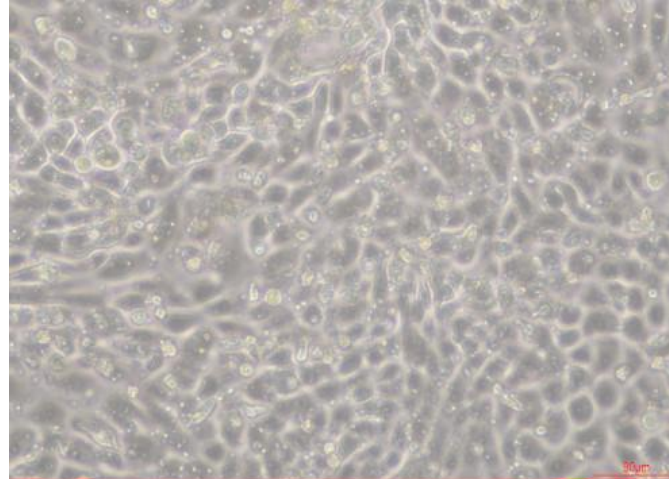
Pflueger et al. 2019, 10.1042/EBC20190029

Edition de l'épigénome

Technique d'édition de l'épigénome

Lignées cellulaires immortalisées :
IPEC-1 et IPEC-J2 (Intestinal Porcine Epithelial Cells)

Transfection transitoire : faible efficacité de transfection



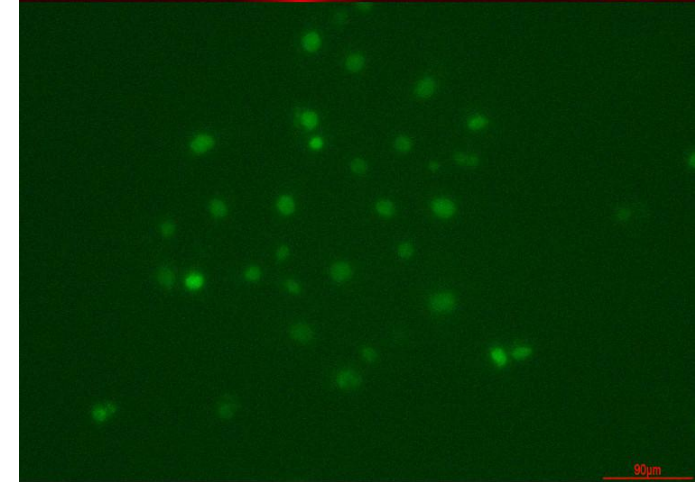
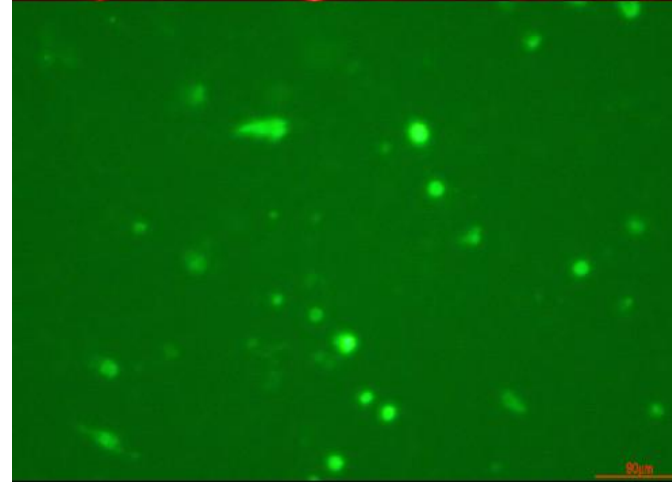
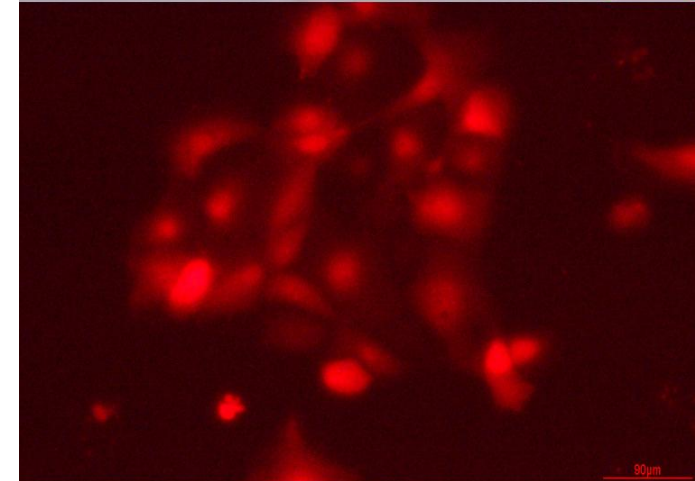
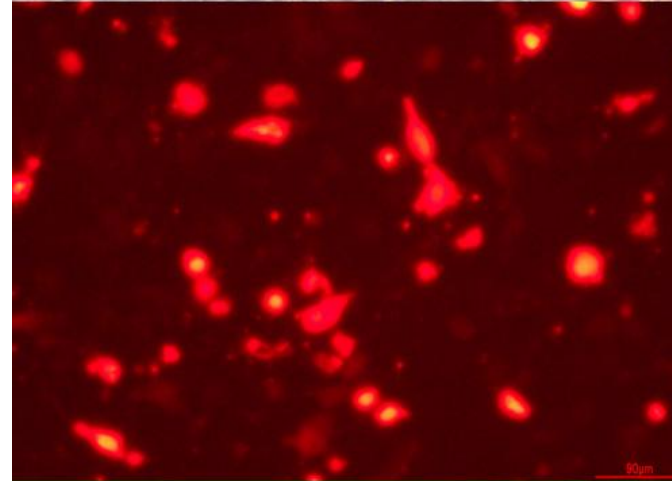
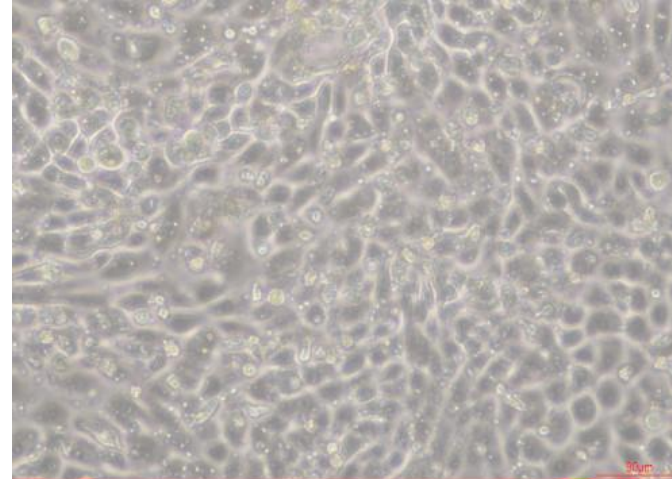
Edition de l'épigénome

Technique d'édition de l'épigénome

Lignées cellulaires immortalisées :
IPEC-1 et IPEC-J2 (Intestinal Porcine Epithelial Cells)

Transfection transitoire : faible efficacité de transfection

Tri cellulaire (FACS): fonctionne, mais mortalité cellulaire à 3 jours.



Edition de l'épigénome

Premiers résultats laborieux mais prometteurs ?

Deux lignées cellulaires:

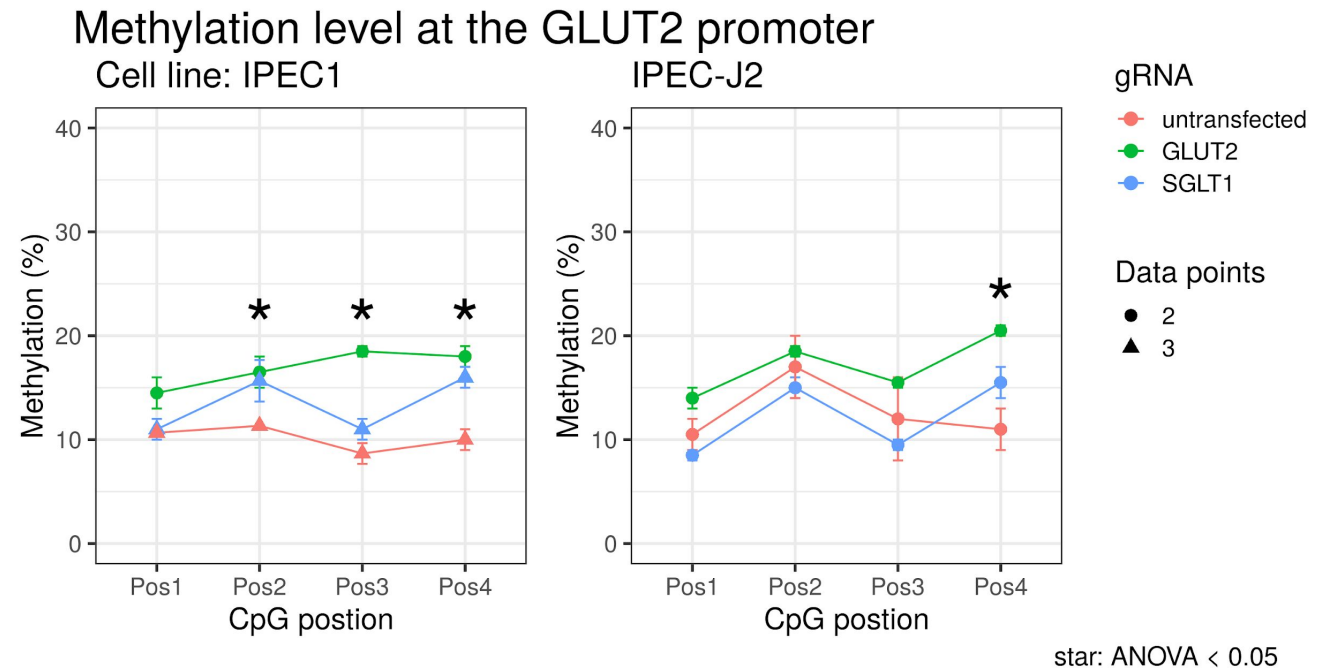
IPEC-1 (gauche) et IPEC-J2 (droite)

Deux ARN guides ciblant:

GLUT2 ou SGLT1, et un témoin non transfecté

Deux régions du génomes analysées:

GLUT2 (en haut) et SGLT1 (en bas)



Edition de l'épigénome

Premiers résultats laborieux mais prometteurs ?

Deux lignées cellulaires:

IPEC-1 (gauche) et IPEC-J2 (droite)

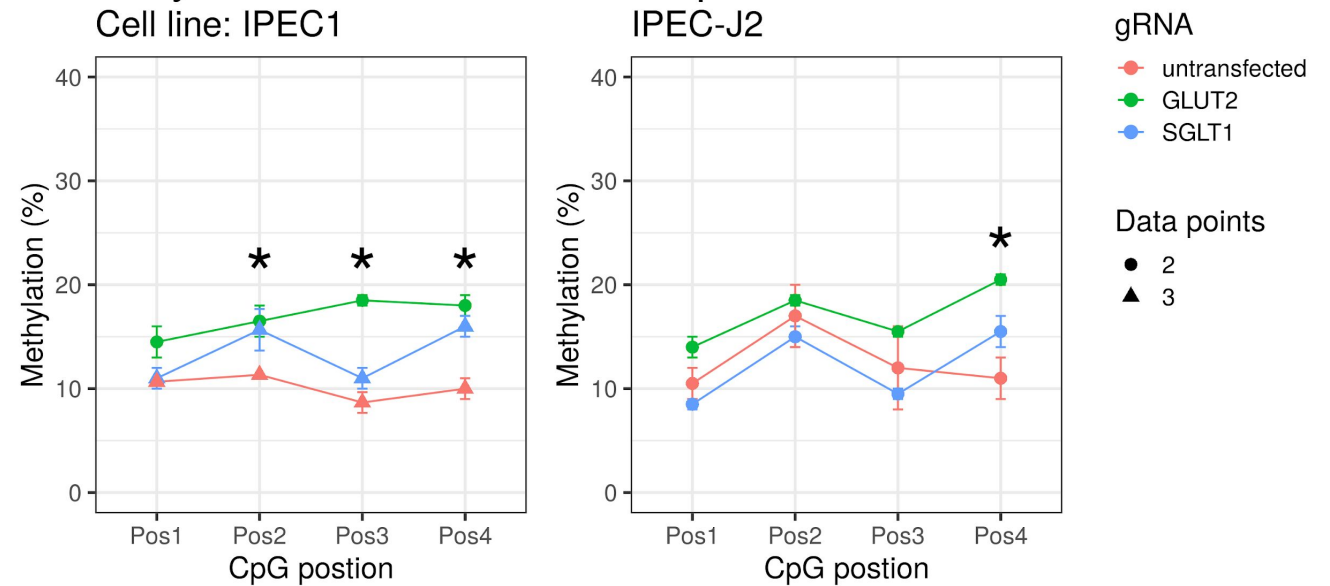
Deux ARN guides ciblant:

GLUT2 ou SGLT1, et un témoin non transfecté

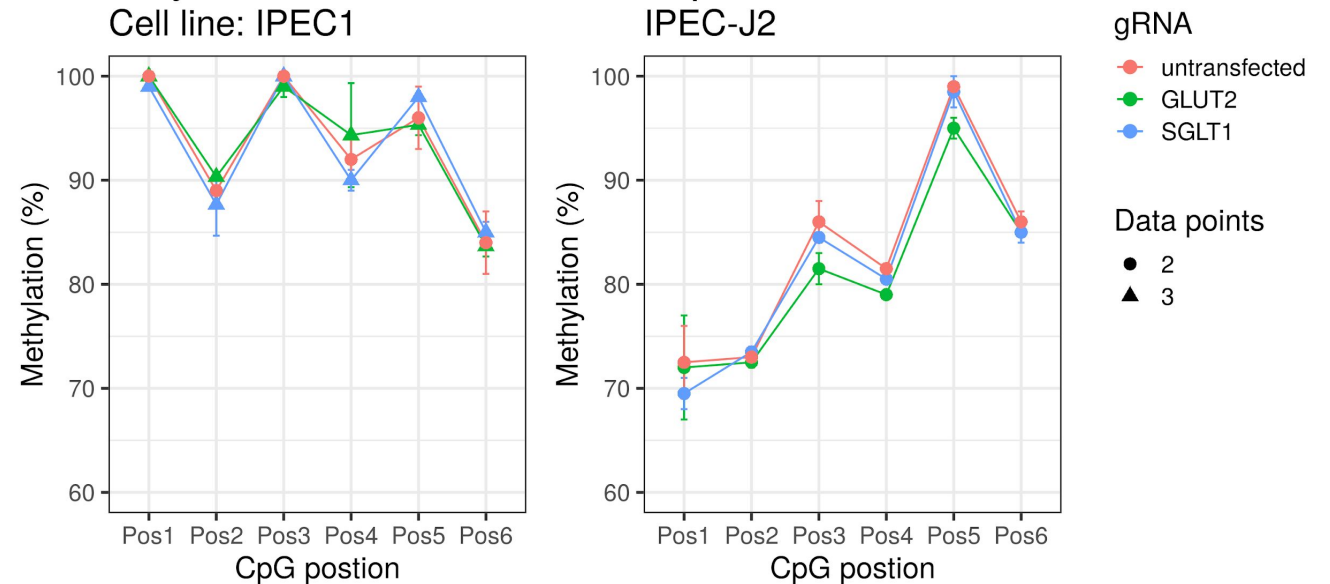
Deux régions du génomes analysées:

GLUT2 (en haut) et SGLT1 (en bas)

Methylation level at the GLUT2 promoter



Methylation level at the SGLT1 promoter



Edition de l'épigénome

Perspectives

- Nouveaux plasmides
- Tester sur organoïdes
- Re-tester le tri cellulaire
- Re-tester la sélection puromycine

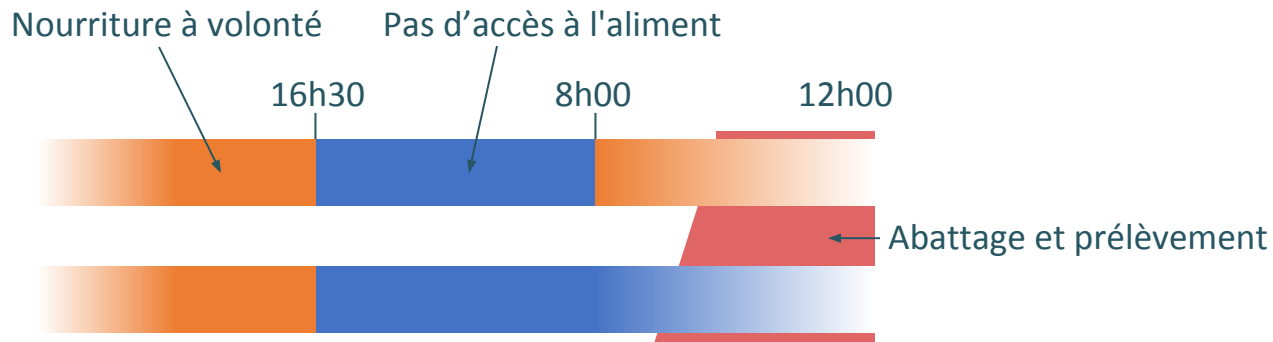


Transcriptome et méthylome de duodénum

Dispositif expérimental

Prélèvement de sang, muqueuse du duodénum et muqueuse de l'estomac sur 24 animaux.

Chantier au Magneraud.

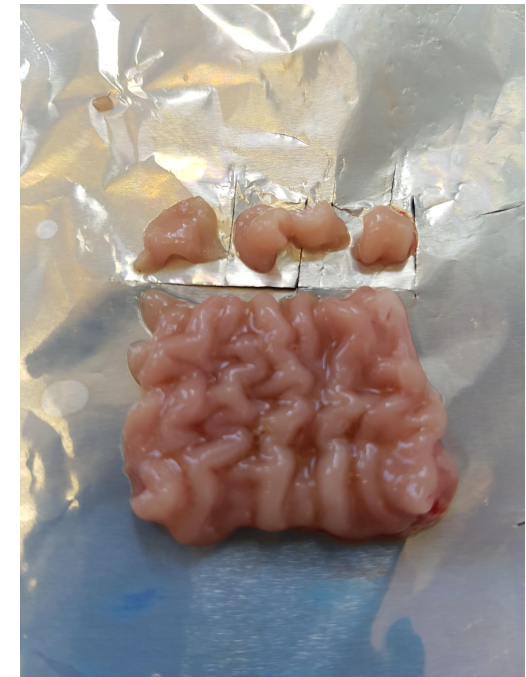


Plan expérimental réalisé:

Génétique	Portée	Sexe	Condition
CMJR+	1	F	à jeun
CMJR+	1	F	rassasié
CMJR+	1	M	à jeun
CMJR+	1	M	rassasié
CMJR+	2	F	à jeun
CMJR+	2	F	rassasié
CMJR+	2	M	à jeun
CMJR+	2	M	rassasié
CMJR+	3	F	à jeun
CMJR+	3	F	rassasié
CMJR+	3	M	à jeun
CMJR+	3	M	rassasié
CMJR-	4	F	à jeun
CMJR-	4	M	rassasié
CMJR-	4	M	à jeun
CMJR-	4	M	rassasié
CMJR-	5	F	à jeun
CMJR-	5	F	rassasié
CMJR-	5	M	à jeun
CMJR-	5	M	rassasié
CMJR-	6	F	à jeun
CMJR-	6	F	rassasié
CMJR-	6	M	à jeun
CMJR-	6	M	rassasié

Transcriptome et méthylome de duodénum

Chantier

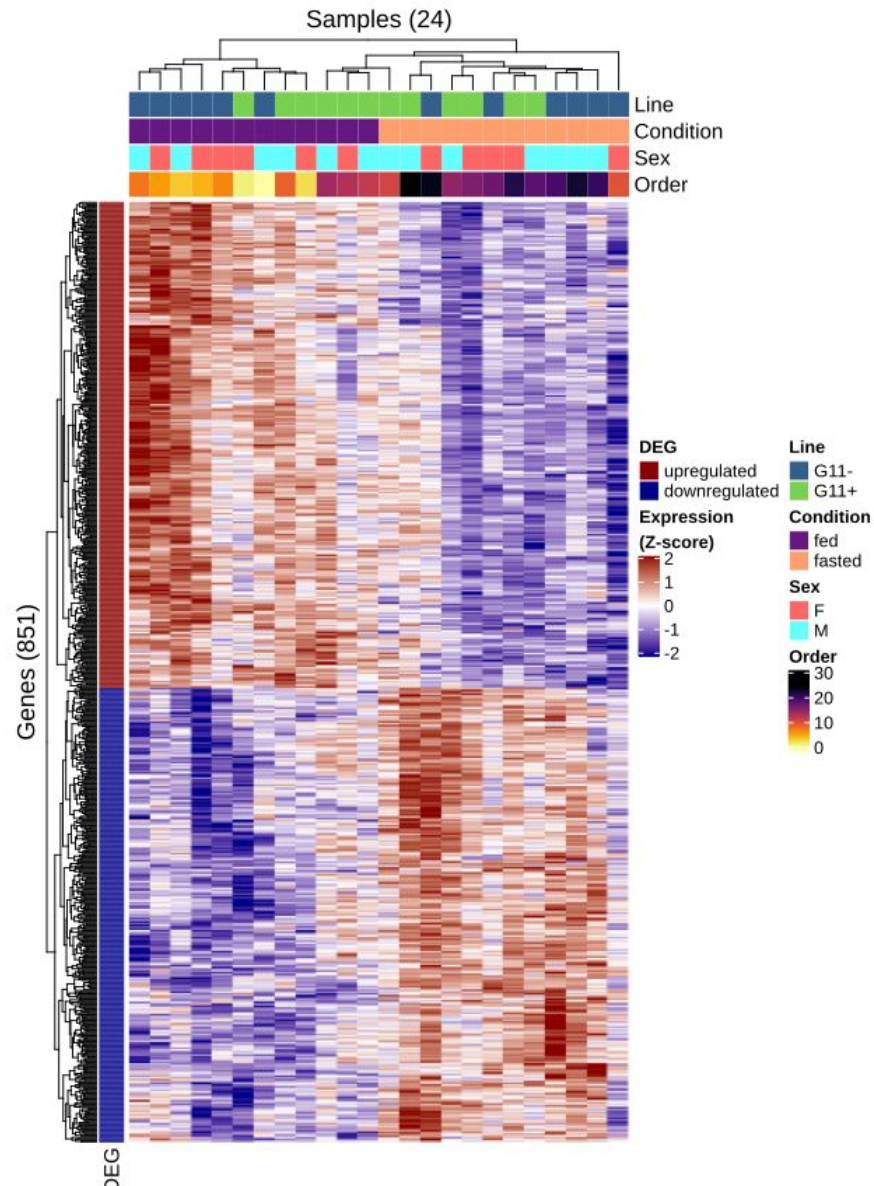


Transcriptome et méthylome de duodénum

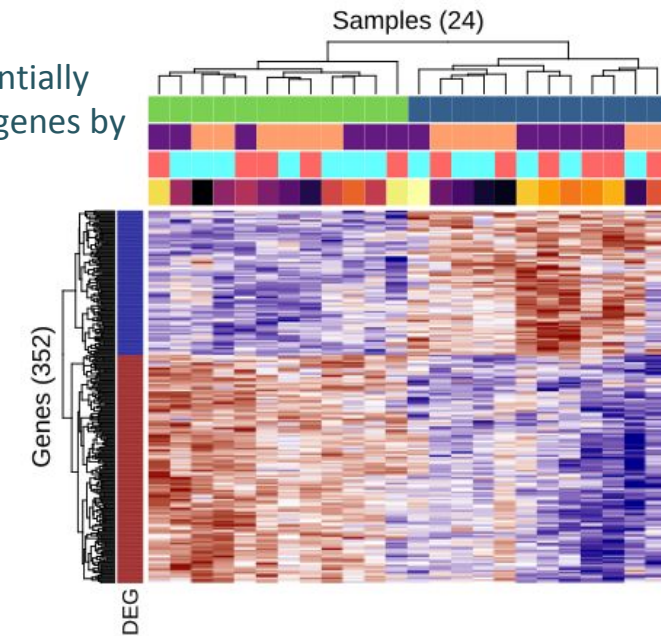
Analyses RNA-seq

nf-core/rnaseq, Salmon, tximport, limma voom. Modèle : $\sim \text{Line} + \text{Condition} + \text{sex}$

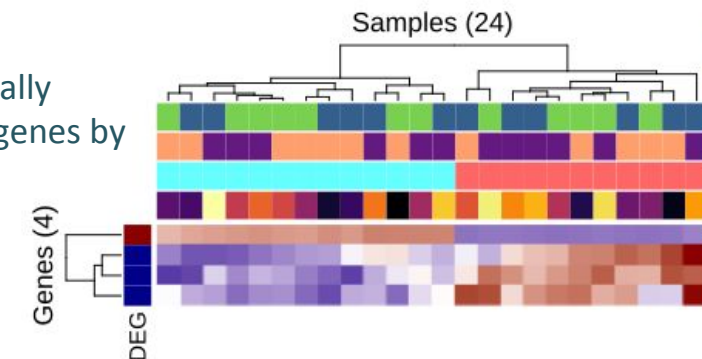
851 differentially expressed genes by condition



352 differentially expressed genes by line



4 differentially expressed genes by sex



Transcriptome et méthylome de duodénum

Perspectives

- Analyses : M2 en Janvier 2021
- Méthylome (librairies en cours de préparation)

ERC starting 2021:

- **WP1:** single cell RNA-seq + DNA methylation, before/after a meal, in different breeds
- **WP2:** Epigenetic editing in cell lines & organoïds
- **WP3:** Engineering milk derived vesicles to deliver cargo to intestinal epithelial cells
- **WP4:** Using epigenetic editing to repress gut hormones in pigs in vivo?
- **WP5:** Social acceptability, economics, marketing, re-branding of epigenetic editing?



Remerciements

Katia Fève
Yann Labrune
Sophie Leroux
Julie Demars
Juliette Riquet
Denis Milan
Frédérique Pitel
Annie Robic

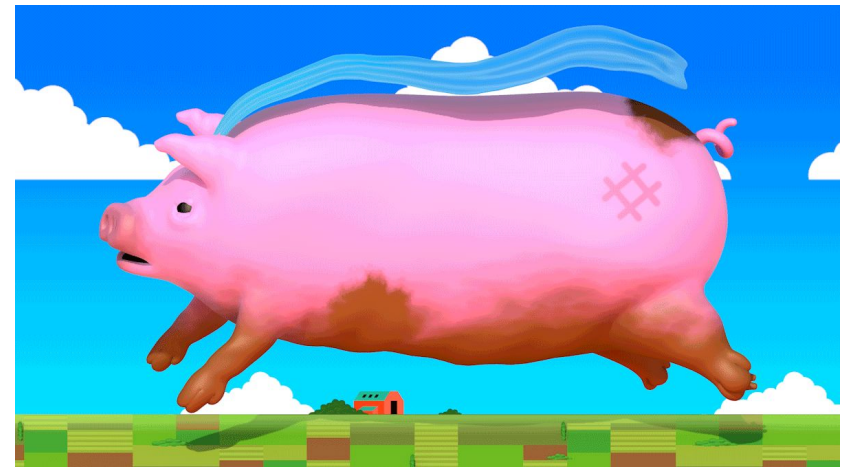
Yvon Billon
Laure Ravon

Hélène Gilbert
Martin Beaumont
Christelle Marraud
Céline Noirot

Philippe Pinton
Abdullah Khoshal

Jérôme Lluch
Olivier Bouchez
Sophie Valière

Toute l'équipe GenEpi
Le département GA



INRAE

Projet ROSEpigs

2020-11-05 / transversalité porcine / Guillaume Devailly