

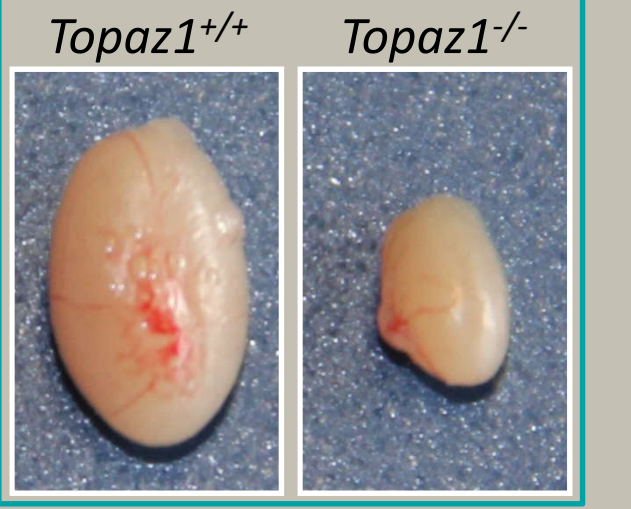
FLAG-TOPAZ1:

Introduction d'une étiquette FLAG à la protéine TOPAZ1 par recombinaison homologue directement dans le zygote

E. Pומרول*, M. Chadourne*, B. Passet[§], J. Castille[§], G. Jolivet*, E. Pailhoux* & B. Mandon-Pépin*

Contexte Topaz1 :

Le gène *Topaz1*, *Testis and Ovary specific PAZ domain gene 1*, a été découvert au laboratoire¹ à partir d'une banque de transcrits ovins dédiés à la méiose foetale femelle. Ce gène est hautement conservé chez les vertébrés, spécifique des cellules germinales et impliqué dans la gamétogenèse des mammifères¹. Afin d'étudier son rôle, une lignée de souris dépourvue de *Topaz1* a été générée, entraînant une stérilité uniquement des mâles *Topaz1*^{-/-} (femelles fertiles)². TOPAZ1 a un rôle fondamental dans la spermatogenèse murine et son absence réprime de nombreux ARN non codants longs (lncRNAs) pendant la spermatogenèse³.

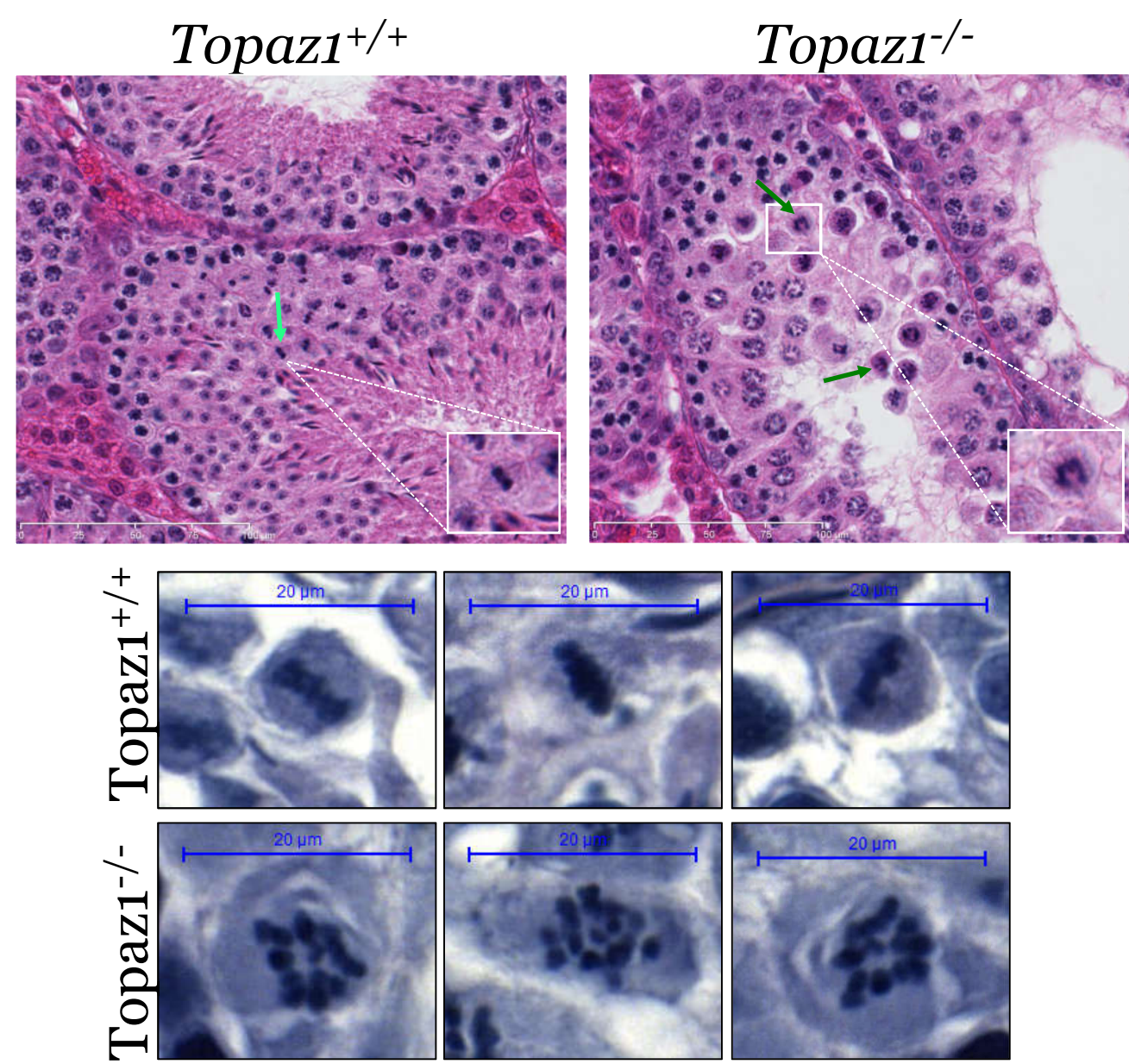


Testicules de souris *Topaz1*^{-/-} : tailles réduites et stérilité des animaux

Histologie testiculaire

L'absence du gène *Topaz1* chez la souris mâle:

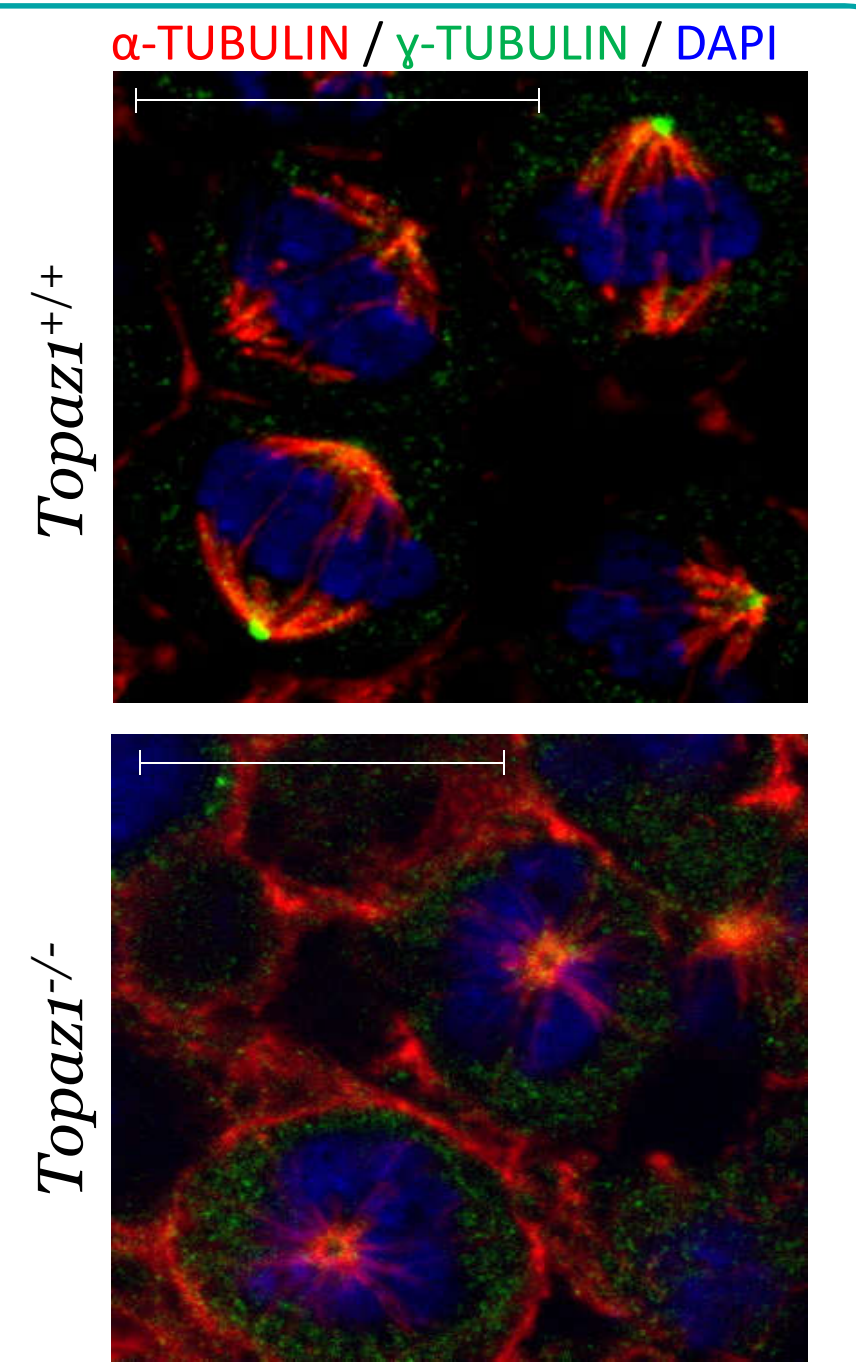
- Absence de cellules germinales haploïdes
- Blocage méiotique
- Apoptose des cellules germinales
- Stérilité
- Métaphase anormale
- Blocage lors de la transition: Prophase I → Métaphase I



Immuno-marquage: fuseaux métaphasiques

L'absence du gène *Topaz1* dans les spermatocytes:

- Perturbation du fuseau de microtubules
- Fuseau d' α -tubuline en forme de "rosette" (hémi-fuseau)
- Centrosome anormal: pas de migration du centriole fille (attesté par le marquage γ -tubuline) aux pôles de la cellule
- Pas de ségrégation des chromosomes en méiose I



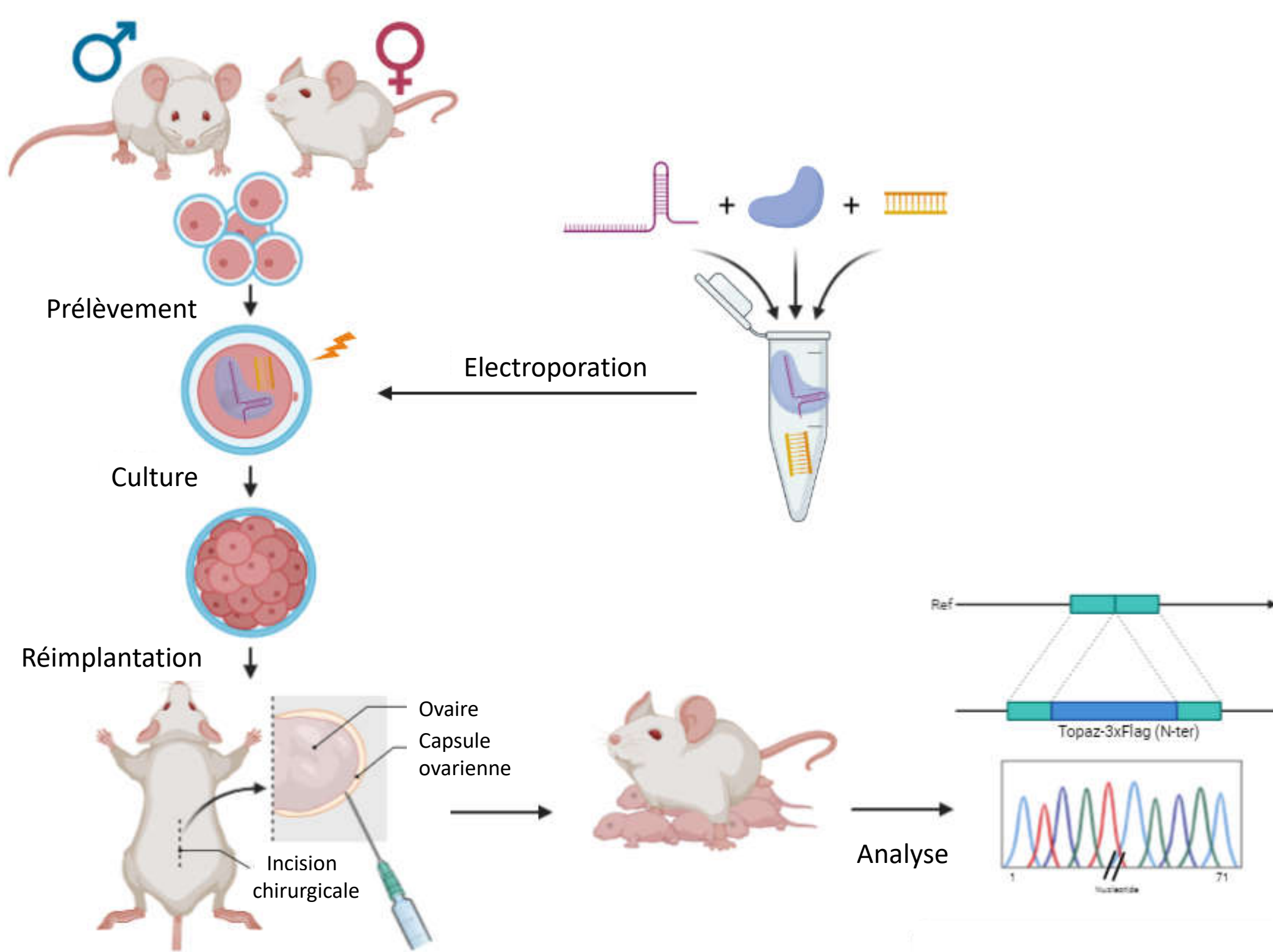
L'une des difficultés dans la compréhension du mécanisme d'action de TOPAZ1 réside dans l'absence d'un anticorps spécifique anti-TOPAZ1

Objectif:

Mettre en œuvre la technologie d'édition génique CRISPR/Cas9 dans le but d'obtenir une petite étiquette immuno-déTECTABLE ("Flag tag") sur la protéine *Topaz1* murine → Création d'une lignée "FLAG-TOPAZ1"

I. Intégration d'un FLAG (3X) à la faveur d'une recombinaison homologue dans l'embryon murin (Coll. GABI – INRAE)

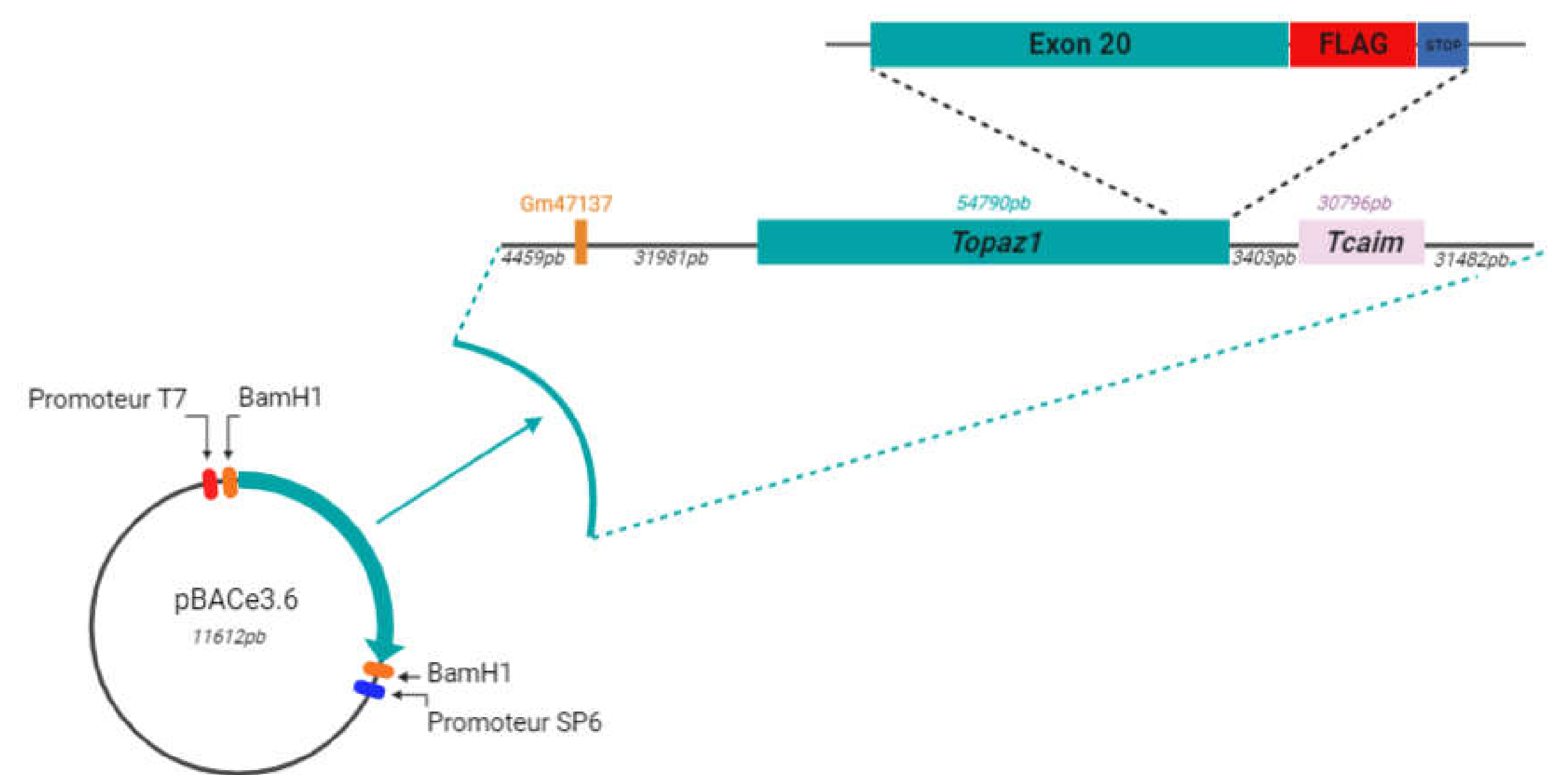
- Production de gRNA et ARNm Cas9
- Production d'ADN "donneur" comportant le FLAG (3X)
- (a) En N-term: exon 1 du gène *Topaz1* ou (b) C-term: exon 20 avant le codon STOP



- ✓ 500 embryons de souris micro-injectés
- ✓ Naissance de souriceaux F0
- ✓ Aucun porteur du gène *Topaz1*-FLAG intègre

II. Intégration d'un BAC chimère par transgénèse additive (PBES - ENS Lyon)

- Intégration d'un FLAG* en 3' du gène *Topaz1* murin
- Construction à partir d'un BAC contenant le gène *Topaz1*
- Transgénèse additive chez la souris (ovocytes)



- ✓ Obtention de 4 fondateurs F0 : - dont 2 avec le gène *Topaz1*-FLAG intègre
- ✓ 1 seul animal F0 transmet le gène *Topaz1*-FLAG intègre aux F1
- ✓ Obtention de 17 animaux F1 (avec 3 copies du gène *Topaz1*-FLAG)
- ✓ Création d'une lignée de souris F2 (en cours de génotypage)

*1 motif FLAG: peptide DYKDDDDK

Perspectives:

- Localisation précise de la protéine TOPAZ1 lors de la spermatogenèse et la méiose
- Recherche des partenaires et cibles de TOPAZ1
 - partenaire protéique (CoIP)
 - interaction avec des ARNs (comme des lncRNAs → cf réf [3]) (RIP-Seq)

Références:

- [1] Baillet A, et al. *PLoS One*. 2011;6(11):e26950;
- [2] Luangpraseuth-Prosper A, et al. *Dev Biol* 2015;406:158-171.
- [3] Chadourne et al. *Front. Cell. Dev. Biol.* 2021; doi: 10.3389/fcell.2021.700290.