



HAL
open science

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

Elodie Pומרol, Manon Chadourne, Bruno Passet, Johann Castille,
Geneviève Jolivet, Eric Pailhoux, Béatrice Mandon-Pepin

► To cite this version:

Elodie Pומרol, Manon Chadourne, Bruno Passet, Johann Castille, Geneviève Jolivet, et al.. Introduction d'une étiquette FLAG à la protéine TOPAZ1 par recombinaison homologue directement dans le zygote. Journée d'animation Scientifique PHASE, May 2022, Futuroscope, Poitiers, France. hal-03777393

HAL Id: hal-03777393

<https://hal.inrae.fr/hal-03777393>

Submitted on 14 Sep 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

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 gaméto-genèse 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.

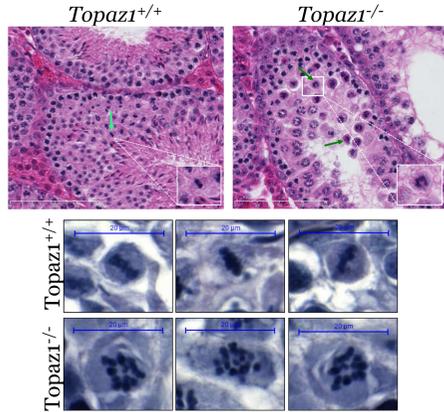


Testicules de souris *Topaz1*^{-/-} : tailles réduites et stérilité des animaux

Histologie testiculaire

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

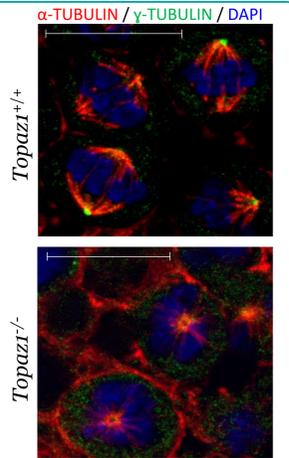
- Absence de cellules germinales haploïdes
- Blocage méiotique
- Apoptose des cellules germinales
- Stérilité
- Métaphase anormale
- Blocage lors de la transition: Prophase I → Métaphase I



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



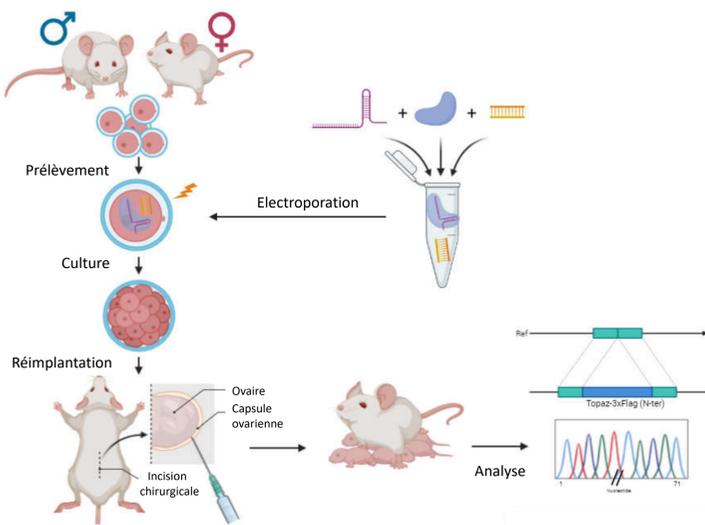
L'une des difficultés dans la compréhension du mécanisme d'action de TOPAZ1 réside dans l'absence d'un anticorps spécifique anti-TOPAZ1

Objectif:

Mettre en œuvre la technologie d'édition génique CRISPR/Cas9 dans le but d'obtenir une petite étiquette immuno-délectable ("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)

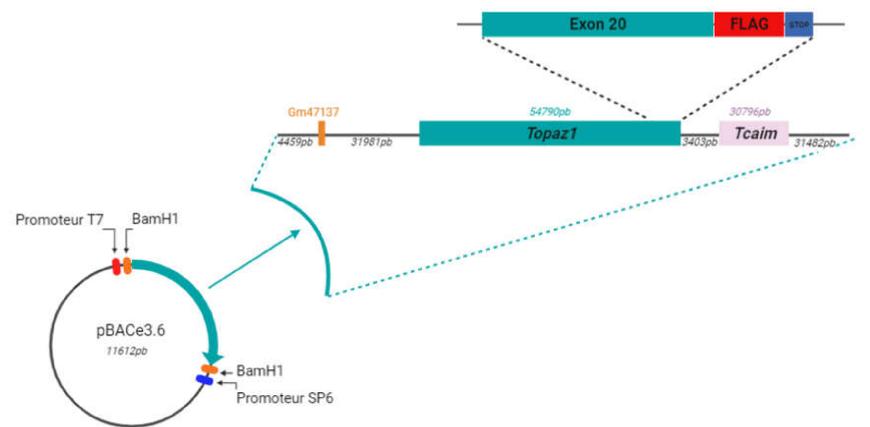
- Production de gRNA et ARNm Cas9
- Production d'ADN "donneur" comportant le FLAG (3X)
- (a) En N-term: exon 1 du gène *Topaz1* ou (b) C-term: exon 20 avant le codon STOP



- ✓ 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.