



La mutation du gène *parla* chez les poissons-zèbres et son implication dans la maladie de Parkinson

uOttawa

Maxime Tartaglia, Rawan Merhi, Marc Ekker
Département de biologie, Université d'Ottawa

Introduction

La maladie de Parkinson est une pathologie neurodégénérative touchant près de 100 000 Canadiens et Canadiennes. Elle se caractérise notamment par la perte de neurones dopaminergiques au niveau de la substantia nigra des noyaux gris centraux, ce qui provoque des tremblements, de la rigidité musculaire et de la bradykinésie. Bien que traditionnellement associée à des facteurs environnementaux, des études récentes démontrant l'origine génétique de certaines formes de la maladie de Parkinson ont permis d'identifier plusieurs gènes liés à celle-ci, dont le gène *presenilin-associated rhomboid-like (PARL)*.

Le but de cette étude est d'approfondir les mécanismes fonctionnels et expressionnels de l'un des paralogs *PARL*, *parla*, chez le poisson-zèbre, dont l'organisation cérébrale présente des similitudes avec celle de l'humain, utilisant des techniques de génotypage pour identifier les mutants de première génération (F1) (F1 sont nés d'un parent sauvage et d'un parent mutant, dont le gène *parla* a subi une délétion d'exon). La découverte de mutants chez les individus F1 nous permettra de créer une lignée de poissons zèbres mutants pouvant ensuite être utilisée pour étudier les implications fonctionnelles du gène *parla* sur les mécanismes dégénératifs de la maladie de Parkinson.

Méthodologie

La mutation (saut d'exon) est introduite chez des individus (qui deviendront plus tard les parents) à l'aide de CRISPR/Cas9 guidé par un ARN.

La détection de la mutation chez la génération F1 utilise la technique de génotypage. Un petit échantillon de nageoire postérieure est prélevé chez un individu, puis lysé à l'aide d'hydroxyde de sodium (NaOH 50 mM) (**Figure 2**).

Les échantillons sont ensuite incubés à 95°C pour une période de 10 minutes, puis neutralisés à l'aide de tris-HCl (1 M). Pour pouvoir visualiser convenablement les segments d'ADN collectés, une *polymerase chain reaction (PCR)* est effectuée. Ceci permet d'amplifier une séquence d'ADN spécifique en générant un grand nombre de copies de celle-ci. La **Figure 3** dépeint les substances nécessaires à la PCR ainsi que leur quantité respective. Le mélange final contenu dans le microtubule est incubé pendant 30 cycles (58°C pour 45 secondes, puis 72°C pour 30 secondes).

L'électrophorèse sur gel d'agarose (**Figure 1**) est finalement complétée pour nous permettre de visualiser les segments d'ADN prélevés plus tôt et analyser la présence ou non d'une mutation.

Résultats

Quatre tests de dépistage d'ADN ont été menés chez quatre séries de poissons zèbres de parents différents (tous des mutants) pour tenter de déceler des individus F1 mutants. Malheureusement, aucun mutant F1 n'a été observé.

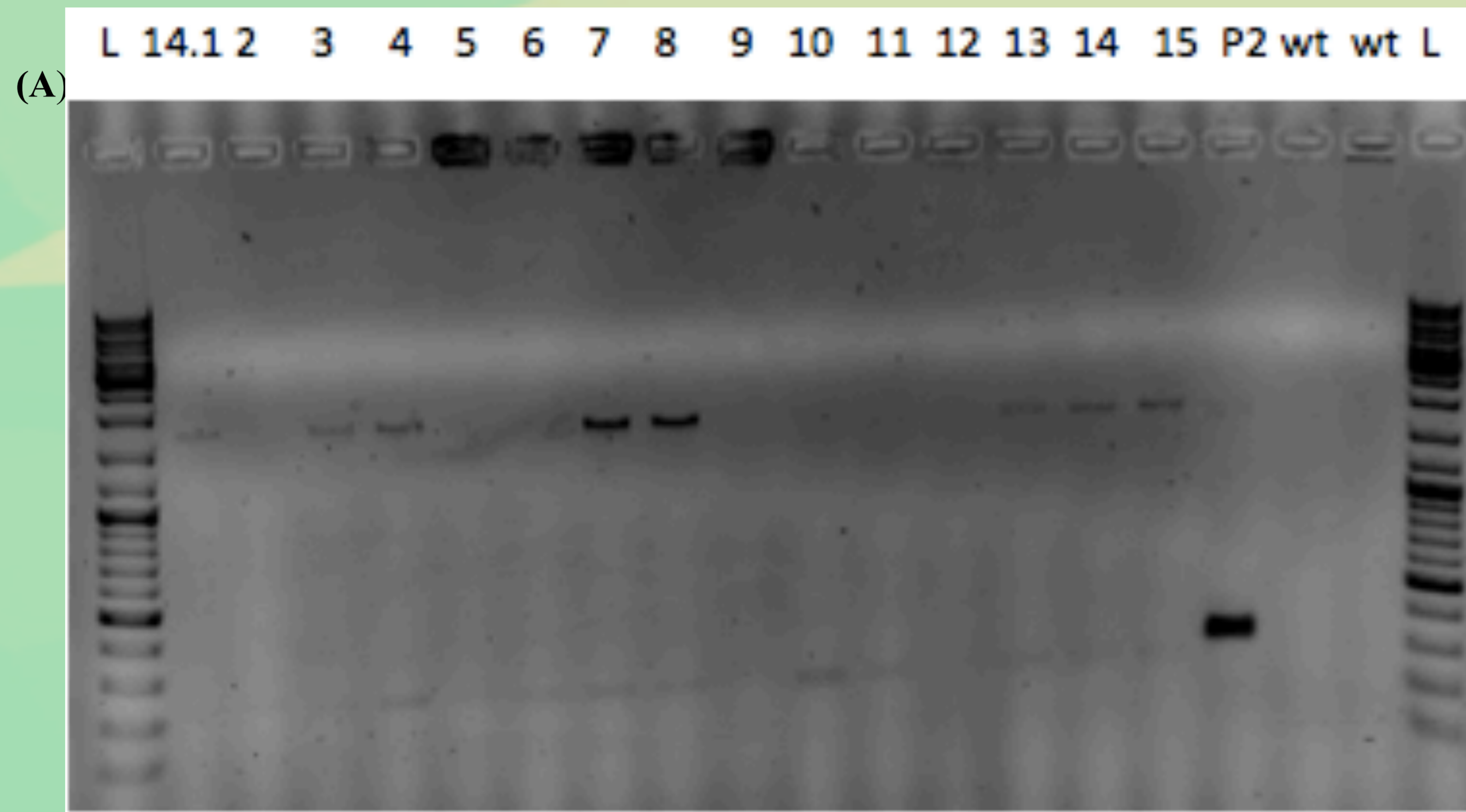


Figure 1. (A) Résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN provenant de 15 individus F1 (1 à 15) ainsi que 2 individus sauvages (WT) et 1 individu mutant pour le gène *parla* (P2). Les deux dernières colonnes (L) représentent les marqueurs de poids moléculaire (**B**), références utilisées pour déterminer le nombre de paires de bases des fragments d'ADN étudiés. Lorsqu'un fragment d'ADN est soumis à un courant électrique (130 V pendant 45 minutes), ce dernier migre sur une surface poreuse (gel d'agarose) de la cathode vers l'anode (l'ADN ayant une charge négative à pH physiologique) en fonction de sa masse moléculaire. La présence du gène *parla* muté chez les individus F1 peut ainsi être détecté en sachant la masse moléculaire approximative (≈ 300 paires de bases) du fragment attendu, de sorte que la présence d'une bande dans la colonne de l'individu P2 vis-à-vis le marqueur correspondant à cette masse nous permet de confirmer la présence de la mutation. L'absence d'une telle bande indique un individu qui ne possède pas la mutation. Les individus 1 à 15 ne sont donc pas mutants (ADN normal à masse moléculaire plus élevé). La visualisation des bandes est permise par le *safe red*.

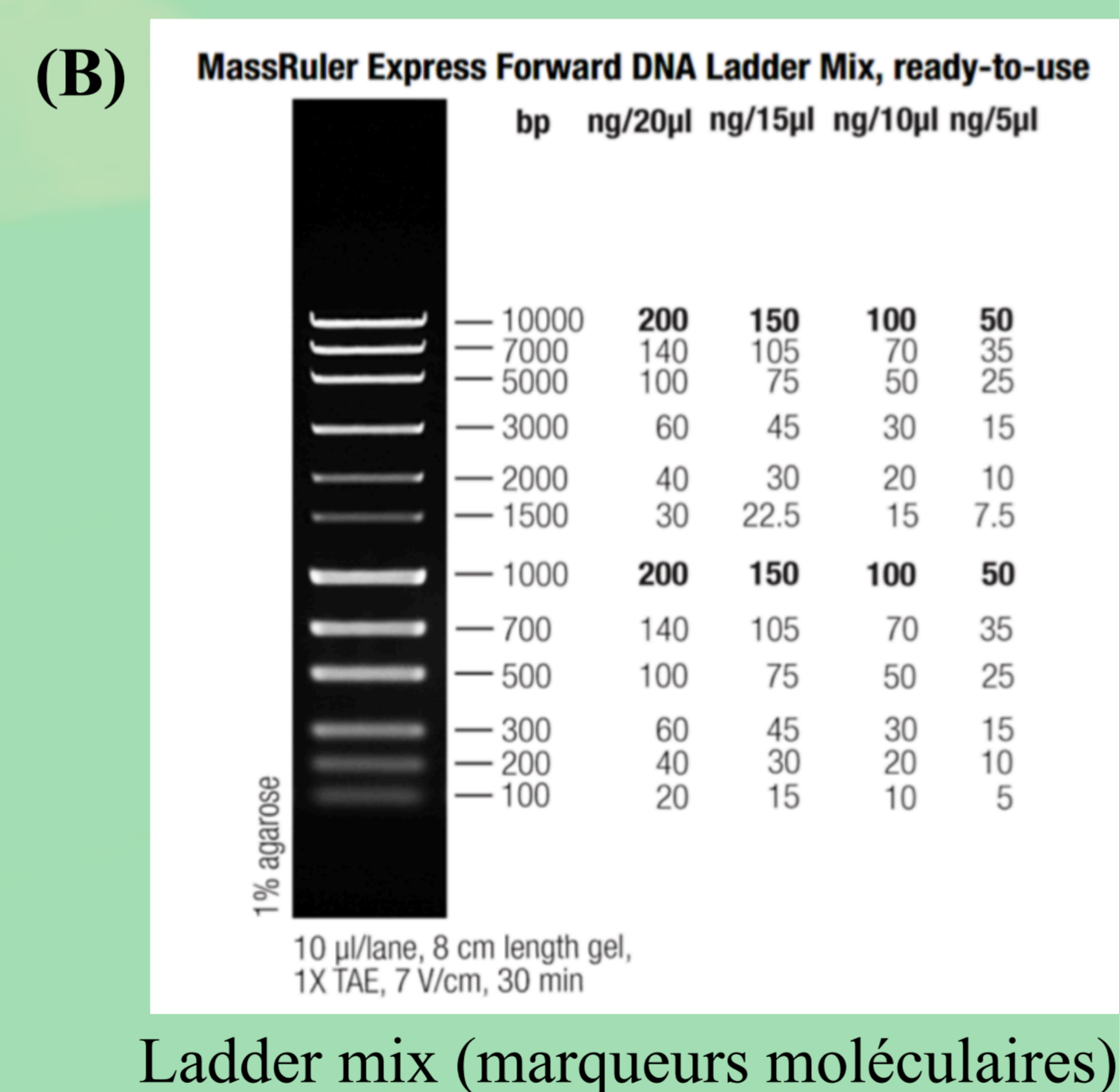


Figure 2. Prélèvement d'une portion de la nageoire postérieure d'un individu de la génération F1 sous anesthésie (tricaine).

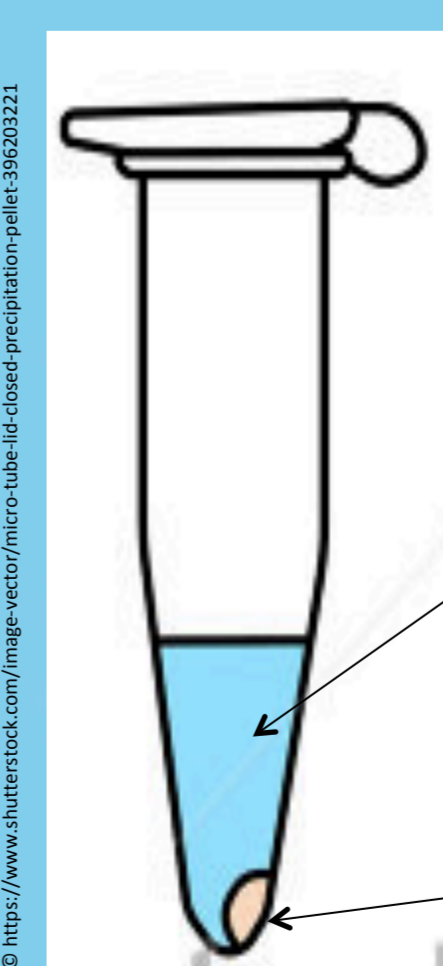


Figure 3. Préparation PCR en vue de l'analyse de l'ADN des individus

- GoTag mix
- Fw 4 primer
- Fw 1-3 primer
- Eau nanofiltrée
- Échantillon (ADN)

Résidus biologiques (nageoire)

Conclusion

Aucun mutant pour le gène *parla* ne fut trouvé et ce, après plus de deux ans d'étude (menée par Mme Merhi). Les quatre tests de dépistage effectués entre les mois de janvier et mars furent tous négatifs et similaires à la **Figure 1**. Les raisons pour lesquelles les mutants ne sont pas observés sont encore inconnues, mais pourraient être liées à des malfunctions des mécanismes d'insertion de sa mutation chez les parents. Une autre hypothèse avancée est celle du mosaïcisme, soit la présence de cellules mutées et non mutées au sein d'un même individu, suggérant ainsi que l'échantillon de nageoire du témoin positif (F₀) contenait la mutation alors que ses cellules germinales ne la contenaient pas. La descendance de ce poisson est donc négative pour la mutation, tel que montré ici. D'ailleurs, un nouveau protocole prévoyant une analyse des embryons est avancé.



© http://galicry33.amazonaws.com/zebrafish.png

Références

1. Société Parkinson Canada. (2013). Parkinson: Les faits. <http://www.parkinson.ca/wp-content/uploads/Parkinson-Les-faits.pdf>
2. Spinazzi, M. et De Strooper, B. (2016). PARL: The mitochondrial rhomboid protease. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 60: 19-28.
3. Liu et collab. (2016). CRISPR/Cas9 in zebrafish: an efficient combination for human genetic disease modeling. *Hum Genet* 136: 1-12.
4. Ata, H., Clark, K.J. et Ekker, S.C. (2016). The zebrafish genome editing toolkit. *Methods in Cell Biology* 135: 149-170.
5. McQuibban, G.A. et Bulman, D.E. (2011). The PARLance of Parkinson disease. *Autophagy* 7:7 : 790-792.
6. Noble et collab. (2012). Zebrafish Parla- and Parlb- deficiency affects dopaminergic neuron patterning and embryonic survival. *Journal of Neurochemistry* 122: 196-207.

Remerciements

J'aimerais remercier toute l'équipe du laboratoire du Dr. Ekker, en particulier Rawan Merhi pour sa patience et son accompagnement ainsi que le Dr. Marc Ekker pour son aide et ses conseils précieux. Merci également au programme d'initiation à la recherche au premier cycle (PIRPC) et au bureau de recherche au premier cycle.