

ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la Vie et de la Santé
UMR 7104 I.G.B.M.C.

THÈSE présentée par :

Damien MARECHAL

soutenue le : **06 décembre 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

Implication de la région *Abcg1-U2af1* dans
le syndrome de Down :
Effets de doses de la région et rôle du gène *Cbs*
dans les défauts de mémorisation.

THÈSE dirigée par :
Yann HERAULT

Directeur de Recherche, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :
Jean-Maurice DELABAR
François ROMAN

Directeur de Recherche, Université Paris Diderot - Paris VII
Professeur des universités, Université d'Aix Marseille I

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Henri BLEHAUT
Katia BEFORT
Jean-Christophe CASSEL

Directeur de Recherche, Fondation Jérôme LEJEUNE
Chargé de Recherche, Université de Strasbourg
Directeur de Recherche, Université de Strasbourg

Remerciements

Tout mon parcours scientifique n'aurait pu aboutir sans l'aide de nombreuses personnes. Je souhaiterais remercier en premier lieu mon directeur de thèse Yann Hérault qui m'a accueilli, dès mon initiation en laboratoire, au sein de son équipe. Il m'a apporté, par sa confiance et son encadrement, les meilleures conditions de travail possibles ; mon arrivée à Strasbourg a énormément enrichi mes connaissances et relations scientifiques. Il restera pour moi un exemple de carrière professionnelle indiscutable. Ma formation de jeune étudiant est née à l'IEM à Orléans. Je remercie tous les gens présents à cette époque pour m'avoir soutenu et motivé dans la poursuite de mon cursus. A ce titre, je remercie Patricia qui fut ma tutrice et qui m'a ouvert les yeux sur le monde de la science, l'équipe Immuno, avec qui les relations extra professionnelles ont complété mon aventure dans le Loiret. Le déplacement de mon équipe à Strasbourg m'a permis de comprendre et de participer à l'installation d'un laboratoire et ce fut une occasion unique. Je tenais à remercier du fond du cœur tous mes collègues de l'équipe Aneupath21 : Véronique et Arnaud, pour leur culture et les nombreuses discussions scientifiques ; Claire pour la gestion incomparable de tous nos animaux ; Thomas, mon unique compagnon thésard durant ma dernière année, enfin Géraldine, Christel et évidemment Valérie pour toute la bonne humeur qu'elles apportent à l'équipe. Une mention très spéciale « au fond du couloir à droite » à mon ami Johan avec qui je compte reformer le duo « Monclar-Cozette » dans un futur lointain. Enfin, je remercie les personnes qui ont quitté depuis le laboratoire, Emilie et Matthieu qui m'ont soutenu, écouté et à qui je souhaite une grande réussite dans leur vie et leur carrière. Je remercie également tous les services qui ont participé à mes projets: nos voisins de l'histo, Isabelle arrivant toujours à se rendre disponible avec joie, les plateformes microscopie et biopuces, les différentes équipes animalières (CDTA et ICS). Je remercie également la fondation Lejeune, qui a soutenu mon travail et qui en a reconnu scientifiquement la qualité.

Enfin, je tiens à remercier énormément toutes les personnes extérieures à « mon monde », Eve qui m'a plus que soutenu durant plus de la moitié de ma thèse et j'espère encore longtemps ! Mes parents, sans qui les études ne seraient pas possibles, et mention particulière à ma maman qui a participé activement à la relecture de mon manuscrit.

Merci encore à tous et à bientôt !

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION | 5 |
| <u>I.</u> ORIGINE GENETIQUE | 16 |
| <u>II.</u> DIAGNOSTIC DE LA TRISOMIE 21 | 18 |
| A. LE DIAGNOSTIC HOSPITALIER (SELON LES DOCTEUR E.FLORI, DOCTEUR B.DORAY ET DOCTEUR N. CARELLE DE L'HOPITAL DE STRASBOURG EN 2007) | 18 |
| B. EVOLUTIONS ET FUTURES ORIENTATIONS | 19 |
| 1. LES RISQUES | 19 |
| 2. PERSPECTIVES DE NOUVEAUX OUTILS DIAGNOSTICS | 20 |
| <u>III.</u> D'HIER A AUJOURD'HUI | 22 |
| <u>IV.</u> LES RAISONS DE L'INCIDENCE | 25 |
| A. AGE MATERNEL | 25 |
| B. PRIMIPARITE | 26 |
| C. ENVIRONNEMENT | 27 |
| <u>V.</u> SIGNES CLINIQUES ET COGNITION | 29 |
| A. NIVEAU COGNITIF: | 30 |
| B. NIVEAU STRUCTUREL: | 30 |
| C. L'HIPPOCAMPE | 31 |
| D. LTP ET PLASTICITE SYNAPTIQUE | 32 |
| E. AUTRES TROUBLES NEUROLOGIQUES | 33 |
| <u>VI.</u> VIEILLISSEMENT ET FIN DE VIE DANS LE SYNDROME DE DOWN | 33 |
| <u>VII.</u> RELATION GENOTYPE-PHENOTYPE CHEZ LES PATIENTS | 35 |
| <u>VIII.</u> MODELES MURINS DU SYNDROME DE DOWN | 36 |
| A. LE CHROMOSOME 21 | 36 |
| B. LES MODELES ANIMAUX | 38 |
| 1. Ts65DN | 39 |
| 2. Ts1RHR | 41 |
| 3. Tc1 | 41 |

| | |
|---|----|
| 4. MODELES IMPLIQUANT LE MMU17 : Ts1YAH/Ms2YAH ET Dp(17)Yey | 42 |
| 5. LES GENES DE L'INTERVALLE <i>ABCG1-U2AF1</i> | 43 |
| 6. LE GENE <i>CBS</i> | 45 |

MATERIEL ET METHODE

| | |
|---|----|
| I. BIOLOGIE MOLECULAIRE - GENOTYPAGE | 58 |
| A. EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE | 58 |
| B. REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE (PCR) | 58 |
| 1. LIGNEE Tg(CAMKII- <i>CRE</i>)4 RENOMMEE Tg(CRE) | 59 |
| 2. LIGNEE Tg(<i>GFP-HCBS</i>)N°157 RENOMMEE Tg(HCBS) | 59 |
| 3. LIGNEE CBS ^{TM1UNC} RENOMMEE CBS +/- | 60 |
| 4. LIGNEE Tc1 | 61 |
| C. FABRICATION D'UNE SONDE ADN MARQUEE A LA DIGOXYGENINE (DIG) | 62 |
| 1. LA REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE (PCR) | 62 |
| 2. PURIFICATION DE LA MATRICE D'ADN | 63 |
| 3. MARQUAGE DE LA SONDE D'ADN A LA DIGOXIGENINE (DIG) | 63 |
| 4. PURIFICATION DE LA SONDE SUR COLONNE G50 SEPHADEX | 63 |
| 5. DOSAGE DE LA SONDE PAR IMMUNOBLOTTING | 64 |
| D. METHODE DE SOUTHERN | 65 |
| 1. DIGESTION ENZYMATIQUE D'ADN GENOMIQUE ET TRANSFERT SUR MEMBRANE | 65 |
| 2. HYBRIDATION DE LA SONDE MARQUEE A LA DIG ET DETECTION AU CDP-STAR | 66 |
| 3. DESHYBRIDATION ET REHYBRIDATION DE LA MEMBRANE DE NITROCELLULOSE | 66 |
| E. HYBRIDATIONS TRANSCRIPTOMIQUES SUR PUCES AFFYMETRIX | 67 |
| 1. EXTRACTION DES ARN TOTAUX | 67 |
| 2. HYBRIDATION SUR PUCES | 68 |
| F. PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL (QUANTITATIVE REAL-TIME PCR) | 69 |
| II. TESTS DE COMPORTEMENT | 71 |
| 1. LE CHAMP OUVERT | 72 |
| 2. LA RECONNAISSANCE D'OBJETS | 73 |
| 3. LA PISCINE DE MORRIS | 74 |
| 4. LE LABYRINTHE EN Y | 76 |
| 5. LE TEST DE LA BARRE TOURNANTE (ROTAROD) | 77 |
| 6. LE TEST RECONNAISSANCE SOCIALE | 78 |

RESULTATS

| | |
|---|----|
| I. Etude du modèle Ms2Yah, monosomie de la région <i>Abcg1-U2af1</i> (article en annexe p.129) | 81 |
|---|----|

| | |
|--|-----------|
| A. GENOTYPAGE | 82 |
| B. LE CHAMP OUVERT (OPEN-FIELD) | 83 |
| C. LA PISCINE DE MORRIS | 86 |
| 1. VERSION MEMOIRE SPATIALE PLATEFORME CACHEE | 86 |
| 2. VERSION MEMOIRE SPATIALE PLATEFORME CACHEE REVERSAL | 88 |
| 3. VERSION MEMOIRE DE TRAVAIL PLATEFORME CACHEE | 90 |
| D. LE TEST DE SOCIABILITE | 93 |
| E. LE ROTAROD : TEST DE LA BARRE TOURNANTE | 97 |

III. IMPLICATION DE LA CBS DANS LES PHENOTYPES COGNITIFS DE LA TRISOMIE 21 101

| | |
|--|------------|
| A. Ts1YAH : ANALYSE DU PROFIL D'EXPRESSION DES CELLULES DE L'HIPPOCAMPE. | 101 |
| 1. ANALYSE DES DONNEES BRUTES « ROBOT MULTIARRAY AVERAGE » | 101 |
| 2. EVALUATION DES FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES ALTEREES VIA LE LOGICIEL D.A.V.I.D. (HUANG ET AL. 2009) | 104 |
| B. GENE CANDIDAT CBS : ANALYSE COMPORTEMENTALE DE LA COHORTE Ts1YAH X CBS +/- | 107 |
| 1. GENOTYPAGE | 107 |
| 2. VARIATION DE POIDS | 108 |
| 3. TEST EN CHAMP OUVERT | 108 |
| 4. TEST DE MEMORISATION EN PISCINE DE MORRIS VERSION PLATEFORME CACHEE | 110 |
| 5. LE LABYRINTHE EN Y | 112 |
| 6. LE ROTAROD | 113 |
| 7. LE TEST DE RECONNAISSANCE D'OBJETS | 115 |
| C. GENE CANDIDAT CBS : ANALYSE COMPORTEMENTALE DE LA COHORTE TG(GFP-HCBS)95-157 X TG(CAMKII-CRE)VERIFICATION DE L'ACTIVATION DU TRANSGENE | 116 |
| 1. GENOTYPAGE | 116 |
| 2. REMANIEMENT GENETIQUE | 117 |
| 3. SEQUENÇAGE DU SITE D'EXCISION DE LA CASSETTE GFP | 118 |
| 4. EXPRESSION DU TRANSGENE H CBS APRES EXCISION | 119 |
| 5. VARIATION DE POIDS | 120 |
| 6. ANALYSE COMPORTEMENTALE DE LA COHORTE TG(GFP-HCBS)95-157 X TG(CAMKII-CRE) | 121 |

| | |
|---|-----|
| Article - Etude du modèle de monosomie Ms2Yah | 136 |
|---|-----|

| | |
|-------------------|------------|
| DISCUSSION | 168 |
|-------------------|------------|

| | |
|-------------------|------------|
| CONCLUSION | 184 |
|-------------------|------------|

| | |
|--------------------|-----|
| Références-annexes | 185 |
|--------------------|-----|

Table des illustrations

| | |
|---|----|
| <i>Figure 1 Erreurs de division cellulaires résultant une aneuploïdie. (N= ensemble des chromosomes haploïdes; x= ensemble des chromosomes mal ségrégés).</i> | 17 |
| <i>Figure 2: Caractérisation génétique d'un nouveau-né féminin porteur d'un chromosome surnuméraire 21 par un technique de FISH (à gauche) et un caryotype (à droite).(Antonarakis, Lyle, Dermitzakis, Reymond, & Deutsch, 2004).</i> | 18 |
| <i>Figure 3: Exemple d'une nouvelle méthode de comptage de marqueurs uniques.</i> | 21 |
| <i>Figure 4 Recensement des anomalies congénitales des pays membres de l'EUROCAT de 1980-2010 (LB= live births; FD= foetal deaths; TOPFA= termination of pregnancy for foetal anomaly / N= number of cases ; Rate per 10 000 births).</i> | 23 |
| <i>Figure 5 Recensement des anomalies congénitales des pays membres de l'EUROCAT de 2005-2010.</i> | 23 |
| <i>Figure 6 Recensement des anomalies chromosomiques / syndrome de Down des pays membres de l'EUROCAT de 1980-2010 et 2005-2010.</i> | 24 |
| <i>Figure 7 Recensement des cas de syndrome de Down dans les villes de Strasbourg et Paris de 1980-2010 et 2005-2010</i> | 24 |
| <i>Figure 8 Nombres de naissances vivantes pour 100 femmes/âge (INSEE France - données estimation de population et statistiques de l'état civil).</i> | 25 |
| <i>Figure 9 Augmentation de la proportion d'ovocytes T21 dans l'ovaire âgé. (Cercles noirs= nombre total d'ovocytes (axe y) en fonction de l'âge (axe x) ; ligne rose= nombre prédictifs d'ovocytes T21 de la naissance à la ménopause ; carrés noirs= l'incidence observée (axe y droit) de T21 selon l'étude de (C. R. Morris et al., 2012)).</i> | 26 |
| <i>Figure 10 Evolution de l'âge moyen à la maternité en France depuis 1900</i> | 27 |
| <i>Figure 11 Influence de la prise de contraception orale (OC) sur l'incidence de la trisomie 21 chez les mères de moins de 35 ans.</i> | 27 |
| <i>Figure 12 Prévalence des naissances annuelles de SD (au même âge maternel) à Berlin Ouest et dans les 7 régions combinées de l'étude (Allemagne, Ecosse, Angleterre, Hongrie, Pologne, Bélarusse et</i> | |

| | |
|--|----|
| <i>Suède</i>) ; en ligne discontinue est représentée la prévalence observée et en ligne continue la prévalence théorique par extrapolation..... | 28 |
| <i>Figure 13</i> Fréquence d'association des phénotypes recensés dans le syndrome de Down | 29 |
| <i>Figure 14</i> Les différents types de mémoires chez l'homme | 30 |
| <i>Figure 15</i> Organisation structurelle (à gauche) et fonctionnelle (à droite) de l'hippocampe. | 31 |
| <i>Figure 16</i> Représentation des régions synténiques entre le chromosome humain 21 Hsa21 et les chromosomes souris Mmu10, 16 et 17 (Antonarakis et al., 2004). | 37 |
| <i>Figure 17</i> Schémas des principaux modèles murins de trisomies partielles créés au niveau des 3 régions de synténie. | 38 |
| <i>Figure 18</i> Cycle de la méthionine et ses voies métaboliques interconnectées (Huang 2010). | 45 |
| <i>Figure 19</i> Schéma des réactions générant la synthèse d'H ₂ S catalysées par les enzymes de la voie de transsulfuration inverse et la voie catabolique de la cystéine (Singh & Banerjee, 2011). | 46 |
| <i>Figure 20</i> Courbe de survie de patients avec un taux d'Hcy ≤ 20 μmol/l (ligne noire) ou avec un taux > 20 μmol/l (ligne grise). Il est observé une différence significative entre les deux cohortes (p=0.001) (Maurer et al., 2010). | 48 |
| <i>Figure 21</i> Mesure quantitative par Western Blot de la CBS dans le cerveau humain de 6 patients post mortem, âgés de 35 semaines (35W), 2 ans (2Y) et 50 ans (49/50Y). La CBS est augmentée d'environ 2,5 fois chez les patients SD par rapport aux contrôles (Ichinohe et al., 2005). | 50 |
| <i>Figure 22</i> Des concentrations physiologiques (130μM) de H ₂ S facilitent l'induction de la LTP dans l'hippocampe après une faible stimulation tétanique, par l'observation des influx nerveux post synaptiques excitateurs (en haut à gauche) et l'amplitude des pics calciques (en bas à gauche) (Abe & Kimura, 1996)..... | 51 |
| <i>Figure 23</i> Fonctions physiologiques éventuelles de l'H ₂ S dans le système nerveux central (Qu et al., 2008)..... | 52 |
| <i>Figure 24</i> <u>Transgène Tg(Gfp-hCbs) avec les couples d'amorces utilisés pour la validation : couple (a) pour la cassette Gfp, (b) le cDNA du gène Cbs humain et (c) amplifie une séquence du site de polyadénylation,</u> | 60 |

| | |
|---|----|
| <i>Figure 25 Photographie d'un film autoradiographique révélant le génotype des individus testés. La sonde utilisée est la sonde « AMPI » s'hybridant sur la cassette amplicilline de l'ADN des souris monosomiques. Les individus 1,2,3,5,6 et 8 sont génotypes Ms2Yah alors que les 4 et 7 sont sauvages.</i> | 81 |
| <i>Figure 26 Photographie d'un gel d'agarose révélant le génotype des individus testés. Les primers utilisés révèlent 2 bandes pour les Tc1 et une seule bande pour les sauvages. Les individus 57,58,59,66,67 et le témoin positif (+) sont génotypes Tc1 alors que les 68,69 et 70 sont sauvages.</i> | 82 |
| <i>Figure 27 Représentations de la distance moyenne parcourue (à gauche) et la vitesse moyenne (à droite) en session champ ouvert (valeurs moyennes \pmSEM).</i> | 83 |
| <i>Figure 28 Représentations de la distance parcourue (à gauche) et la vitesse (à droite) par session de 10 minutes dans le test en champ ouvert (valeurs moyennes \pmSEM).</i> | 84 |
| <i>Figure 29 Décryptage des patterns exploratoires des 4 groupes d'animaux, représentés par le pourcentage de temps passé dans chaque zone (périphérique, intermédiaire et centrale), sur les trois intervalles de temps de la session « open field (valeurs moyennes \pmSEM).»</i> | 85 |
| <i>Figure 30 Courbes d'apprentissage au cours du test version plateforme cachée de la piscine de Morris (valeurs moyennes \pmSEM).</i> | 87 |
| <i>Figure 31 Représentation graphique du premier probe test à travers la mesure de la distance parcourue (en pourcentage) dans l'espace de la piscine, divisé en quadrants (Nord-Est, Nord Ouest, Sud Est, Sud Ouest). Ce probe test est réalisé 24 heures après le dernier jour d'apprentissage (J7) (valeurs moyennes \pmSEM).</i> | 87 |
| <i>Figure 32 Courbes d'apprentissage au cours du test version reversale plateforme cachée de la piscine de Morris (valeurs moyennes \pmSEM).</i> | 88 |
| <i>Figure 33 Représentation graphique du second probe test à travers la mesure de la distance parcourue (en pourcentage) en fonction des quadrants. Ce test est réalisé à J13 (valeurs moyennes \pmSEM).</i> | 89 |
| <i>Figure 34 Représentation graphique du troisième probe test à travers la mesure de la distance parcourue (en pourcentage) en fonction des quadrants. Ce test est réalisé 33 jours après le 1^{er} jour de test (valeurs moyennes \pmSEM.)</i> | 90 |

| | |
|--|-----|
| <i>Figure 35 Courbes d'apprentissage au cours du test version mémoire de travail en version plateforme cachée de la piscine de Morris (valeurs moyennes \pmSEM).</i> | 91 |
| <i>Figure 36 Représentations graphiques des probes tests des jours 1,4 et 10 au cours de la version de mémoire de travail en piscine de Morris ; sont représentées les distances parcourues (en pourcentage) dans les quadrants cibles (valeurs moyennes \pmSEM).</i> | 92 |
| <i>Figure 37 Distance parcourue (en mètres) par les quatre groupes d'animaux au cours de la session d'habituation du test de sociabilité.</i> | 93 |
| <i>Figure 38 Représentation graphique de la distribution temporelle dans les pièces de l'arène du test de sociabilité pour chaque groupe de souris.</i> | 94 |
| <i>Figure 39 Représentation graphique de la distribution temporelle de sniffing entre la chambre 1 (rouge) où est présente la souris actrice et la chambre 2 (bleu) vide durant cette session. Le graphique de gauche représente le temps de sniffing en minutes alors que celui de droite en pourcentage de temps (50% correspondant à une exploration au hasard).</i> | 95 |
| <i>Figure 40 Représentation graphique de la distribution temporelle dans les pièces de l'arène du test de sociabilité pour chaque groupe de souris.</i> | 96 |
| <i>Figure 41 Représentation graphique de la distribution temporelle de sniffing entre la chambre 1 contenant le congénère connu (rouge) et la chambre 2 (bleu) où vient d'être placée la nouvelle souris. Le graphe de gauche représente le temps de sniffing en minutes alors que celui de droite en pourcentage de temps (50% correspondant à une exploration au hasard).</i> | 97 |
| <i>Figure 42 Courbes représentant l'évolution des performances locomotrices sur trois jours d'entraînement (1 à 3) sur un test de maintien statique sur un axe tournant en vitesse accélérée de 4 à 40 rpm. Le graphe de gauche récapitule le temps de chute de chaque génotype en fonction des jours, et le graphe de droite représente la vitesse de chute de chaque génotype en fonction des jours.</i> | 99 |
| <i>Figure 43 Courbes représentant l'évolution des performances locomotrices à vitesses constantes imposées (4, 10, 16, 22, 28, 34, 40 rpm).</i> | 100 |
| <i>Figure 44 Table recensant les tops 10 des gènes sur/sous exprimés de manière significative dans l'hippocampe dans souris Ts1Ya ; la totalité de la table est regroupée en annexe (page)...</i> | 102 |
| <i>Figure 45 Représentation de l'ensemble des gènes dérégulés selon des critères précis et choisis (cf matériel et méthode) sous forme de clusters ; en vert sont répertoriés les gènes statistiquement sous</i> | |

| | |
|--|-----|
| <i>exprimés et en rouge les surexprimés. La liste nominale des gènes est indiquée en annexe page....</i> | 104 |
| <i>Figure 46 Table recensant le top 3 des clusters perturbés dans l'hippocampe des Ts1Yah, après analyses par le logiciel D.A.V.I.D.</i> | 106 |
| <i>Figure 47 Photographie d'un film autoradiographique révélant le génotype des individus testés. Les ADN ont été digérés par l'enzyme EcoRI et révélés par la sonde AMPI. La digestion autour de la cassette Néomycine chez les individus Ts1Yah fait apparaître une bande de grande taille (environ 10kb) et une bande plus petite (environ 3200kb). Les individus 1et 9 sont génotypés wt ; l'individu 2 est Cbs +/- ; les individus 5,6 et 7 sont Ts1Yah et les individus 2,3 et 8 sont des individus dits « doubles mutants » Ts1Yah/Cbs.....</i> | 107 |
| <i>Figure 48 Tableau récapitulatif de la valeur du poids moyen des souris, après la période de tests comportementaux (souris âgées de 26 semaines)..</i> | 108 |
| <i>Figure 49 Représentations de la distance moyenne parcourue (à gauche) et la vitesse moyenne (à droite) en session champ ouvert (souris âgées de 12 semaines – fond C57BL/6J ; valeurs moyennes ±SEM).....</i> | 109 |
| <i>Figure 50 Représentations de la distance moyenne parcourue dans les différentes zones de l'arène (périphérique, intermédiaire et centrale), par intervalle de 10 minutes sur la totalité de la session (30 min).....</i> | 110 |
| <i>Figure 51 Courbes d'apprentissage de la cohorte Ts1Yah x Cbs +/- au cours du test version plateforme cachée de la piscine de Morris. Cette expérience se déroule en une phase d'apprentissage de 5 jours où est évaluée la capacité de mémorisation spatiale des souris, puis une phase de test « cued » où les souris se dirigent grâce à un repère visuel placé sur la plateforme afin de déterminer les performances visuelles (souris âgées de 12 semaines – fond C57BL/6N ; valeurs moyennes ±SEM).....</i> | 111 |
| <i>Figure 52 Représentation graphique du second probe test à travers la mesure du temps passé par quadrant (en pourcentage). Ce test est réalisé à J6.</i> | 112 |
| <i>Figure 53 Représentation graphique du nombre total de bras visités par les 4 groupes génotypiques durant la session de 8 minutes dans le labyrinthe en Y (souris âgées de 16 semaines – fond C57BL/6J ; valeurs moyennes ±SEM)</i> | 112 |
| <i>Figure 54 Représentation graphique de l'alternance spontanée calculée pour les 4 groupes génotypiques durant la session de 8 minutes dans le labyrinthe en Y.....</i> | 113 |

| | |
|---|-----|
| <i>Figure 55 Représentation graphique des performances locomotrices, à travers l'évaluation de la latence de chute (graphe de gauche) et de la vitesse à laquelle a lieu la chute (graphe de droite), des 4 groupes composant la cohorte (souris âgées de 15 semaines – fond C57BL/6N ; valeurs moyennes \pmSEM).</i> | 114 |
| <i>Figure 56 Représentation graphique des performances locomotrices, à travers l'évaluation de la latence de chute (graphe de gauche) et de la vitesse à laquelle a lieu la chute (graphe de droite), des 4 groupes composant la cohorte (valeurs moyennes \pmSEM).</i> | 115 |
| <i>Figure 57 Représentation graphique du test de reconnaissance d'objets ; le temps passé sur l'objet nouveau (rouge) et le familier (bleu) sont évalués en pourcentage par rapport au temps global d'exploration (souris âgées de 12 semaines – fond C57BL/6J ; valeurs moyennes \pmSEM).</i> . | 115 |
| <i>Figure 58 Photographie d'un gel d'agarose révélant le génotype des individus testés. Les primers utilisés révèlent 1 bande pour les individus CRE et aucune bande pour les sauvages. 4 génotypes ont été analysés (1=wt ; 2=Tg(Hcbs) ; 3=Tg(Cre) ; 4=Tg(Hcbs)/Tg(Cre). Chaque chiffre représente l'ADN de 2 individus distincts du génotype concerné.</i> | 116 |
| <i>Figure 59 Validation du remaniement génétique dans les souris porteuses des transgènes Gfp-Hcbs et Cre. La Figure A représente la construction du transgène des souris Tg(Gfp-Hcbs)95-157 avant et après excision de la Gfp par la Cre. Sont également représentés les couples d'amorces utilisées pour l'amplification des séquences nécessaires au fonctionnement du transgène (a=couple encadrant les loxP ; b=couples amplifiant le transgène Hcbs comparé au gène contrôle de la myosine (250 pb) ; c=couple dédié à la séquence codante du polyA SV40). La Figure B présente les résultats de PCR après migration sur gel selon les 4 génotypes (1=wt ; 2=Tg(Hcbs) ; 3=Tg(Cre) ; 4=Tg(Hcbs)/Tg(Cre)). Chaque chiffre est représenté par 2 ADN distincts.</i> | 118 |
| <i>Figure 60 Expression relative des gènes de la CBS murine (Mmcb) et du transgène humain (Hscb) dans le cervelet, cortex et hippocampe des souris sauvages comparée aux souris doubles transgéniques.</i> | 120 |
| <i>Figure 61 Tableau récapitulatif de la valeur du poids moyen des souris, hors de la période de test comportemental.(âge environ 6 mois \pm1 semaine).</i> | 121 |
| <i>Figure 62 Représentation graphique de la distance parcourue dans l'arène durant la session « open field » de 30 minutes.</i> | 121 |
| <i>Figure 63 Représentation graphique du nombre total d'entrées dans les bras du labyrinthe.</i> | 122 |
| <i>Figure 64 Représentation graphique de l'alternance spontanée dans les 3 bras du labyrinthe.</i> | 122 |

| | |
|---|-----|
| <i>Figure 65 Représentation graphique des performances locomotrices, à travers l'évaluation de la latence de chute (graphe de gauche) et de la vitesse à laquelle a lieu la chute (graphe de droite), des 4 groupes composant la cohorte (valeurs moyennes \pmSEM).</i> | 123 |
| <i>. Figure 66 Représentation graphique des performances locomotrices, à travers l'évaluation de la latence de chute (graphe de gauche) et de la vitesse à laquelle a lieu la chute (graphe de droite), des 4 groupes composant la cohorte (valeurs moyennes \pmSEM).</i> | 124 |
| <i>Figure 67 Représentation graphique du test de reconnaissance d'objets ; le temps passé sur l'objet nouveau (rouge) et le familier (bleu) sont évalués en pourcentage par rapport au temps total d'exploration. Le graphique est basé sur les moyennes par groupe \pm SEM.</i> | 125 |
| <i>Figure 68 Table récapitulative de l'ensemble des gènes dérégulés dans l'hippocampe des souris Ts1Yah.(Test post hoc student ; * pour $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$).</i> | 135 |
| <i>Figure 69 Schéma de positionnement des objets selon la mémoire ciblée par le protocole : (A) Nouvel d'objet ; (B) Localisation de l'objet ; (C) Positionnement des objets et (D) Ordre de présentation des objets.</i> | 181 |
| <i>Figure 70 Représentation graphique de l'évolution du nombre de publications par année depuis 1990 avec pour thématique le syndrome de Down (données PubMed).</i> | 184 |

Abréviations

| | |
|-----------------|--|
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADNc | Acide désoxyribonucléique complémentaire |
| AI | Agoniste inverse |
| ARN | Acide ribonucléique |
| BET | Bromure d'éthidium |
| Cbs +/- | Cbs hétérozygote |
| CDP-Star | Disodium 2-chloro-5-(4-méthoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1.3,7]decan}-4-yl)-1-phenylphosphate |
| CNV | Variant en nombre de copie |
| DEPC | Diethylpyrocarbonate |
| DIG | Digoxygénine |
| dl | Décilitre |
| dNTP | desoxyribonucléotide triphosphate |
| dpc | Jour après la fécondation |
| DSCR | région critique du syndrome de Down |
| EDTA | Ethylène DiamineTétraAcétate |
| FC | Fold Change |
| g | Gramme |
| GFP | Protéine fluorescente verte |
| Hcbs | gène de la CBS humaine |
| H | Heure |
| HCl | Acide chlorhydrique |
| Hcy | Homocystéine |
| Hsa | <i>Homo sapiens</i> |
| Hsa21 | Chromosome 21 humain |
| Kb | Kilobase |
| KO | Knock-out |
| Mb | Mégabase |
| mg | Milligramme |
| MgSO4 | Sulfate de magnésium |
| MICER | Mutagenic Insertion and Chromosome Engineering Resource |
| min | Minute |
| mm | Millimètre |

| | |
|-----------------------|---|
| mM | Milli-molaire |
| Mmu | Mus musculus |
| Mmu10,16 et 17 | Chromosome murin 10,16 et 17. |
| MWM | Test de la piscine de Morris |
| NaCl | Chlorure de sodium |
| NaOH | Hydroxyde de sodium |
| NBT/BCIP | Nitro Blue tetrazodium chloride/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidine salt |
| ng | Nanogramme |
| Pb | Paire de base |
| PBS | Tampon phosphate salin |
| PCR | Réaction de polymérisation en chaîne |
| PFA | Paraformaldéhyde |
| PTZ | Pentylentetrazole |
| qPCR | Réaction de polymérisation en chaîne quantitative |
| RMA | Robust multi array |
| rpm | Rotation par minute |
| RT | Transcription inverse |
| s | Seconde |
| SD | Syndrome de Down |
| SEM | Erreur standard à la moyenne |
| snRNA | petit ARN nucléaire |
| snoRNA | petit ARN nucléolaire |
| T21 | Trisomie 21 |
| TE | Tris EDTA |
| Tg | Transgénique |
| U | Unité |
| µl | Microlitre |
| vs | Versus |
| v/v | Ratio volume/volume |

INTRODUCTION

Les connaissances et les technologies adaptées à la génétique ont permis depuis quelques décennies de décrypter des mécanismes de maladies très répandues dans la population : de *fmrp* impliqué dans le syndrome de l’X fragile et qui induit un retard mental plus ou moins sévère (Gedeon et al., 1992), le gène *it-15* qui, lorsqu’il contient un nombre anormal de séquences répétées conduit à la maladie de Huntington, se traduisant par une dégénérescence neurologique (Macdonald et al., 1993) ou encore la drépanocytose/thalassémie qui sont toutes les deux des maladies perturbant la structure des hématies (Chernoff, 1959); ces cas sont étudiés depuis des années et appartiennent aux maladies monogéniques héréditaires, c'est-à-dire transmises par un des deux parents (allèle dominant) ou les deux parents (allèle récessif).

Les techniques dites « nouvelles générations », comme le séquençage, permettent d’observer l’ensemble du génome de ces patients. La quantité et la rapidité d’obtention des données ont augmenté de manière exponentielle ces dix dernières années ; la première séquence du génome humain publiée en 2001 a nécessité 3 ans de travail réalisés par plusieurs équipes d’un consortium international pour un coût de 3 000 milliards d’euros alors qu’aujourd’hui le même résultat demande un mois d’analyses à hauteur de 20 000 euros. Le séquençage haut débit est donc devenu incontournable en clinique et tous les patients néo-syndromiques passent au crible leur génome.

Ce manuscrit est axé sur l’étude du syndrome aneuploïde dont la prévalence est la plus élevée dans le monde : la trisomie 21 ou syndrome de Down. La difficulté voire l’incapacité à explorer certaines fonctions altérées chez les patients nous a conduits à étudier les effets des gènes du chromosome surnuméraire chez un animal modèle qu’est la souris. Notre étude s’est focalisée sur les aspects neurologiques, locomoteurs et sociaux impliquant une région limitée du chromosome 21 humain représentée entièrement sur le chromosome 17 murin.

LE SYNDROME DE DOWN (SD)

Les premiers écrits corrélant la description de patients caractérisés par une idiotie mentale avec des traits physiques de la trisomie 21 ont été attribués à 2 médecins français Edouard Seguin et Jean-Etienne Esquirol. Le syndrome de Down doit son nom au premier personnage qui rassembla des patients présentant un ensemble de traits phénotypiques communs et les décrivit comme atteint «d'idiotie mongoloïde», caractère aujourd'hui révoqué par l'ensemble des médecins/chercheur. En effet, le professeur John Langdon Down a repertorié en 1866 dans son article *Observations sur une classification ethnique des idiots* les premières descriptions physiques et psychologiques des personnes syndromiques. Ce n'est qu'un siècle plus tard que le professeur Jérôme Lejeune a associé le syndrome de Down au caryotype anormal des patients qui possèdent un chromosome 21 surnuméraire.

I. Origine génétique

La trisomie 21 est une aneuploïdie : c'est encore aujourd'hui l'anomalie chromosomique la plus recensée dans le monde avec une prévalence de 1/700 toutes grossesses confondues. Elle provient d'une non-disjonction d'un des deux chromosomes de la paire vingt-et-une. Il existe plusieurs cas possibles selon que la cellule est en phase de division mitotique ou méiotique (gamètes), représentés figure 1.

Le cas le plus courant (e) se rencontre au cours de la formation des gamètes. Il s'agit dans tous les cas pour les aneuploïdies complètes d'une mauvaise ségrégation d'un des chromosomes homologues au cours de la méiose I ou II. Lorsqu'elle se produit en méiose I, l'impact est plus lourd puisque toutes les cellules filles seront aneuploïdes. Ce processus peut se produire aussi bien chez le père (10% des cas) ou la mère (90%) et conduit donc à une pathologie d'origine parentale et non congénitale. Cette erreur est la plus courante dans le cas de la trisomie 21. Les probabilités sont évidemment amplifiées si la mère est elle-même porteuse d'une aneuploïdie ; la transmission se fait à 99% par la mère pour la trisomie 21 car les mâles sont hypofertiles (Stefanidis et al., 2011). Les autres cas ont lieu durant une mitose, c'est-à-dire après la formation de l'œuf. Dans l'exemple du syndrome de Down, l'enfant sera alors soit trisomique « complet » si la mal-ségrégation a lieu très tôt (au cours des deux premières divisions) ou sera trisomique « mosaïque », c'est-à-dire qu'une sous population de ses cellules porteront les trois chromosomes avec proportionnellement autant de cellules monosomiques. Le premier cas (a) apparaît consécutivement à une mutation dans la voie de signalisation du SAC (Spindle-assembly checkpoint) qui est le système enzymatique responsable de l'appariement et de la

séparation des chromatides le long du fuseau mitotique. Durant la ségrégation, une des chromatides n'est pas reliée au fuseau et va migrer aléatoirement, rendant possible une migration d'un chromosome complet ($2N$) dans la même cellule fille qui donnera une quantité $4N$ au moment de la phase de réplication de l'ADN du cycle cellulaire. Dans le second cas (b), le centromère n'est pas efficace et les chromatides sœurs vont se séparer trop tôt. En résulteront deux attachements aux microtubules adjacents provenant d'un même centrosome. Le cas (c) concerne toujours un problème d'attachement, mais cette fois-ci, une des chromatides est attachée aux microtubules des deux centrosomes; il y a ici 50% de probabilités qu'elle soit attirée vers un pôle ou l'autre de la cellule. Enfin la dernière possibilité se traduit par la présence excessive de centrosomes, ce qui entraîne un attachement anarchique des microtubules aux kinétochores et une migration chromatidienne totalement randomisée. (from J.J. Siegel *et al. Reviews in Advance* 2012)

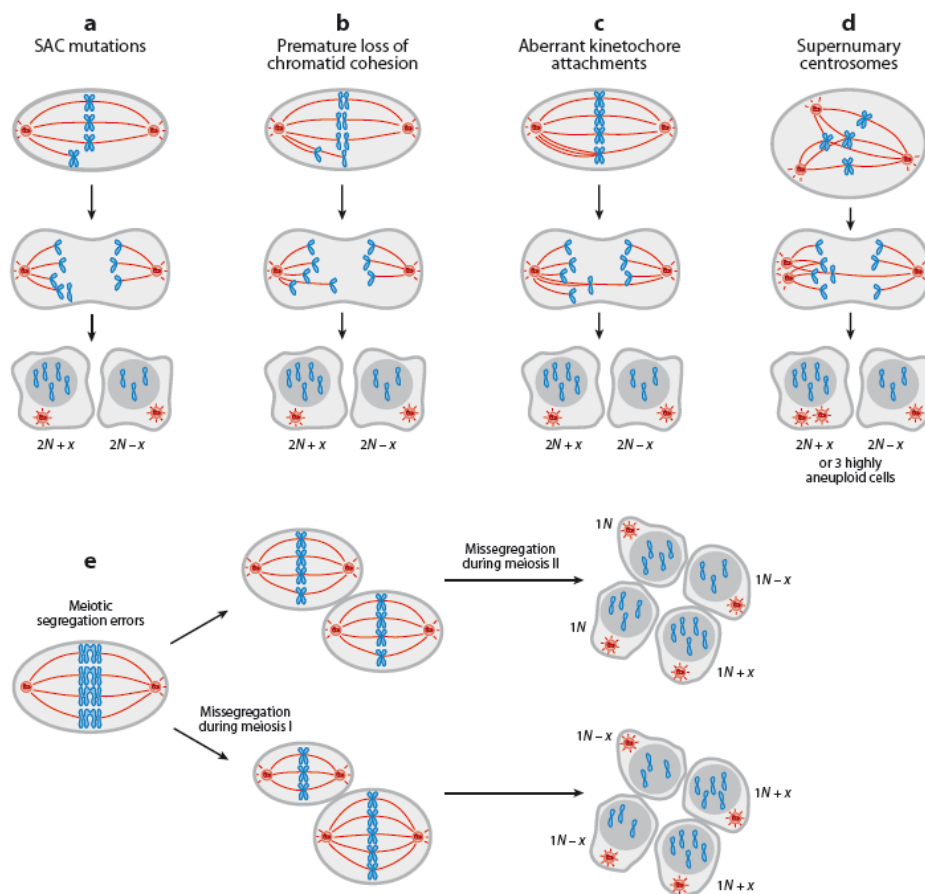


Figure 1 Erreurs de division cellulaires résultant une aneuploïdie. (N = ensemble des chromosomes haploïdes; x = ensemble des chromosomes mal ségrégés).

Cette vue d'ensemble s'adresse à tous les cas d'aneuploïdies connus. Le cas de la trisomie 21 se décline selon seulement 3 formes:

- La forme libre (92-95% des cas) : le chromosome ségrège de manière autonome au moment des mitoses cellulaires. Elle se caractérise par un caryotype à 47 chromosomes (figure 2) et sera de type complète (homogène) ou mosaïque selon le stade auquel s'est produite l'erreur (Cf paragraphe précédent).

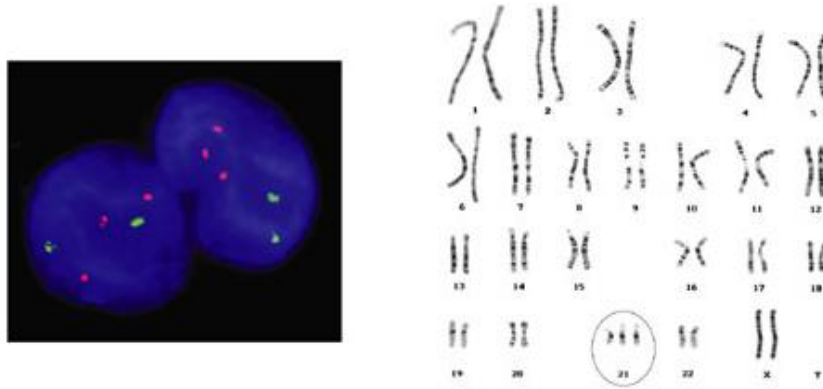


Figure 2: Caractérisation génétique d'un nouveau-né féminin porteur d'un chromosome surnuméraire 21 par un technique de FISH (à gauche) et un caryotype (à droite). (Antonarakis, Lyle, Dermitzakis, Raymond, & Deutsch, 2004).

- Le second cas (3-5%) est la trisomie par translocation : cela se traduit par la fixation d'une partie ou un chromosome entier sur un autosome différent. La plupart du temps elle se produit sur les chromosomes acrocentriques. L'origine est 50% parentale, 50% congénitale. Dans le cas parental, le parent est porteur d'une translocation équilibrée, c'est-à-dire qu'il a un chromosome libre unique et le 2^e fixé.
- Le dernier cas, très rare, regroupe les trisomies partielles; elles résultent d'une cassure accidentelle d'un chromosome pendant la méiose qui va se fixer comme dans le cas des translocations sur un autre autosome. Les symptômes observés sont très hétérogènes puisqu'ils dépendent des gènes impliqués dans cette duplication.

II. Diagnostic de la trisomie 21

A. Le diagnostic hospitalier (selon les Docteur E.FLORI, Docteur B.DORAY et Docteur N. CARELLE de l'hôpital de Strasbourg en 2007)

Chaque cas de grossesse se présentant en maternité est pris en charge selon une méthode au cas par cas. Le risque d'avoir fécondé un embryon T21 est donc différent d'une femme à l'autre et ce risque est évalué selon différents critères aux étapes précoces de la grossesse. Différents marqueurs sont donc observés tout au long de la grossesse :

- L'âge maternel : L'âge retenu en France (38 ans) tient compte du risque individuel de naissance d'un enfant trisomique à cet âge (environ 1%) et du risque iatrogène lié au prélèvement de cellules fœtales (1 à 2%).
- Les marqueurs sériques maternels : En France, un dépistage biologique par les dosages de marqueurs sériques maternels à partir d'un prélèvement de sang maternel peut être effectué vers la 16^{ème} semaine d'aménorrhée. Le triple test comporte le dosage de l'alpha-foeto-protéine (qui est

diminuée dans les grossesses avec foetus trisomique), de l'oestriol non conjugué (également diminué) et de la β -hCG (qui est augmentée). Deux marqueurs au moins doivent être analysés.

- L'échographie du premier trimestre (12 SA) est particulièrement discriminante pour la trisomie 21: un signe majeur est représenté par l'augmentation de la clarté nucale mesurée et interprétée dans des conditions strictes. La labilité de ce signe (qui peut avoir disparu vers 15 SA) impose sa recherche vers 11 ou 12 SA. Des anomalies plus importantes des parties molles (hygroma kystique du cou, œdème sous cutané diffus) peuvent également être observées. L'échographie précoce permet aussi de retrouver des anomalies cardiaques très évocatrices à ce stade de la grossesse d'anomalies chromosomiques, en particulier de trisomie 21. L'échographie morphologique du deuxième trimestre permet de dépister principalement des malformations cardiaques dont, en particulier, le canal atrioventriculaire (risque de trisomie 21 de 40%), et certaines malformations digestives comme la sténose duodénale (risque de trisomie 21 de 30%). Les signes mineurs de la trisomie 21 sont le plus souvent des anomalies de la face (hypoplasie des os propres du nez, protrusion de la langue) ou des extrémités (brachymésophalangie ou clinodactylie du 5ème doigt). Enfin, un certain nombre d'enfants trisomiques naissent au terme de grossesses normales sur le plan échographique.

- Le prélèvement de cellules fœtales : 2 cas se présentent,
 - Si la demande est établie avant la grossesse, et, lorsque le risque de trisomie 21 est élevé (translocation familiale), un prélèvement trophoblastique sera planifié entre la 12e et 13e semaine d'aménorrhée afin qu'une I.V.G. puisse être pratiquée si la mère en fait le choix.
 - Dans le 2^e cas de figure, la décision est prise pendant la grossesse ; ce cas se manifeste souvent en raison de la découverte d'anomalies échographiques. On pourra alors proposer un prélèvement de trophoblaste, une amniocentèse ou un prélèvement de sang fœtal. Le choix de l'une ou l'autre de ces techniques se fera en fonction du terme de la grossesse ainsi que des résultats des examens sériques. Les cellules prélevées seront cultivées pour réaliser d'une part un test cytogénétique de FISH et d'autre part un test de confirmation caryotypique afin de caractériser les anomalies de nombre et d'intégrité des chromosomes.

B. Evolutions et futures orientations

1. Les risques

La *Haute Autorité de Santé* française a publié un rapport en juin 2007 sur l'évaluation des stratégies de dépistage de la trisomie 21. Elle y aborde plusieurs points fondamentaux comme le dépistage et les risques d'enfanter un nouveau-né trisomique. Le **dépistage prénatal** de la trisomie 21 comprend l'ensemble des techniques pouvant être offertes aux femmes enceintes dans le but d'identifier celles présentant un risque augmenté de donner naissance à un enfant atteint. Un résultat

supérieur au seuil de risque choisi n'indique pas la présence d'un fœtus atteint d'un chromosome surnuméraire mais suggère la nécessité de confirmer le diagnostic par d'autres examens. Plusieurs marqueurs peuvent être utilisés et combinés afin de calculer le risque de trisomie 21, dès lors que leur indépendance statistique est démontrée. Le calcul du risque de trisomie 21 fœtale repose sur la pondération du risque lié à l'âge maternel par un facteur de correction lié aux valeurs des marqueurs retenus chez la femme enceinte. Le **risque individuel** de trisomie 21 fœtale, quant à lui, est finalement obtenu en multipliant le risque lié à l'âge maternel par les rapports de vraisemblance des marqueurs utilisés. En fonction du seuil de risque retenu, la femme enceinte sera classée ou non dans un groupe à risque.

$$\text{RI} = \text{R}(\text{âge maternel}) * \text{facteur lié à chaque marqueur de risque}$$

En France, un diagnostic prénatal est proposé aux femmes dont le niveau de risque est estimé à 1/250 au moment du dépistage (le 2^e trimestre), quel que soit leur âge. Cette valeur seuil correspond au risque d'avoir un fœtus atteint de trisomie 21 pour une femme de 38 ans. Avec ce risque, seules 2/3 des trisomies 21 peuvent être dépistées (faux négatifs: 1/3). L'inconvénient de cette méthode est qu'elle induit un grand nombre de diagnostics prénataux "inutiles": il faut en effet 120 amniocentèses pour dépister une trisomie 21.

La plupart des techniques de dépistage fiables restent quand même les techniques invasives de type prélèvement chorio-vitellin ou amniocentèse. L'avenir en clinique serait donc de trouver un test prénatal non invasif et fiable, et peu coûteux, pour obtenir l'information génétique le plus tôt possible. Ainsi les décisions adéquates seront prises pour éviter au maximum des souffrances physiques et morales pour la femme enceinte.

2. Perspectives de nouveaux outils diagnostics

Pour répondre à cette demande, un certain nombre d'industries pharmaceutiques cherchent à développer un moyen efficace à 100% de détecter une aneuploïdie au cours du 1^{er} mois de grossesse. A l'heure actuelle, la première observation (1^{er} trimestre) consiste, comme dit précédemment, en l'analyse des marqueurs sériques et de la clarté nucale. Cette étude permet de détecter 90-94% des fœtus porteurs de la T21 avec un taux de 5% de faux positifs. (*Kagan, Wright, Baker, Sahota, & Nicolaidis, 2008*). Le diagnostic précis est apporté par l'amniocentèse avec un risque de perte fœtale de 0.5 à 1%, et lorsque que ce test a lieu, les grossesses prises en charge sont considérées à haut risque pour la T21 (*Antsaklis et al., 2000*). Le risque de perdre le fœtus prend une ampleur de plus en plus importante qu'un simple pourcentage à l'heure actuelle puisque l'âge maternel, qui est lui aussi un

facteur environnemental d'incidence de la trisomie 21, est de plus en plus tardif, mais nous parlerons de ce point dans un prochain chapitre.

Pour éviter à ces futures mamans des tests trop risqués, des pistes sont explorées pour élaborer des stratégies non invasives de diagnostics prénataux (NIPD). Antsaklis nous propose, dans une revue très récente (2012), une visite des dernières technologies aux mains des chercheurs :

- La découverte des cellules fœtales intactes (cff) dans la circulation maternelle. Cette découverte de la fin des années 90 (Lo et al., 1997) semblait très prometteuse néanmoins quelques désavantages apparurent rapidement. Premièrement la rareté des échantillons (1 cellule/mL de sang maternel), des types de cellules (globules blancs) fœtales peuvent persister des années après la grossesse chez la mère. Cependant, des premières études ont montré qu'il était possible de doser la quantité de marqueurs spécifiques du chromosome 21, ainsi que du chromosome Y (pour anticiper le sexe de l'enfant) dès 8 semaines après la conception ! (Dhallan et al., 2007; Lo, 2009). Des améliorations ont été apportées à cette technique d'extraction cellulaire.

- L'enrichissement du plasma maternel en cff : une étude a montré qu'un traitement au formaldéhyde du sang maternel avant centrifugation permettait d'accroître jusqu'à 6% la quantité de cff détectées (Dhallan et al., 2004). Mais comme souvent, d'autres études tout aussi fiables n'ont montré aucune différence. La remarque que l'on peut faire sur ces études est qu'elles étaient appliquées uniquement dans des cas de grossesse avec un fœtus mâle, avec mesure du taux de marqueurs Y (Gerovassili, Garner, Nicolaidis, Thein, & Rees, 2007). D'autres méthodes alternatives ont été également envisagées :

- L'analyse de marqueurs épigénétiques du chromosome 21. Chaque individu se voit attribuer un code identitaire unique sur son génome entier à travers l'empreinte épigénétique. La plupart du temps, ces modifications sont des méthylations (îlots CpG) / acétylations randomisées (Chim et al., 2008). L'exemple ci-dessous décrit la mesure de la représentation génomique (GR) des chromosomes 14 et 21 dans le plasma d'une mère test (ici porteuse d'un fœtus T21) comparée au plasma d'une mère témoin avec un fœtus euploïde.

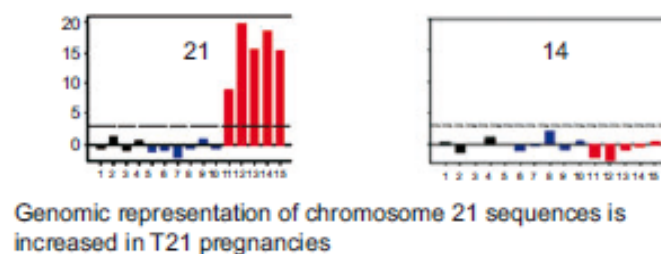


Figure 3: Exemple d'une nouvelle méthode de comptage de marqueurs uniques.

D'autres techniques plus complexes sont aujourd'hui en cours d'investigation comme la PCR digitale ou encore le « Shotgun sequencing DNA » mais ne seront pas détaillées dans ce manuscrit (plus d'informations dans S. Sifakis *et al. J. Perinat. Med.* 2012).

Dernière nouveauté, le lancement sur le marché du premier test de dépistage de la trisomie 21 MaterniT21®. L'entreprise SEQUENOM (San Diego) a fabriqué le premier test ADN qui peut être utilisé au 1^{er} trimestre de grossesse ; ce test pourrait détecter les cellules fœtales dans le sang maternel à partir de la 10^e semaine d'aménorrhée (*Managed Care* 2012). Cet examen non invasif pourrait, avant les tests aujourd'hui de routine, permettre une prise en charge beaucoup plus précoce des grossesses à risques. Selon les résultats des essais thérapeutiques en cours, il serait envisagé la prise d'un traitement beaucoup plus précoce chez la mère. Ce dernier permettrait d'atténuer fortement les effets négatifs de la trisomie 21 notamment au niveau des performances cognitives du futur nouveau-né.

III. D'HIER A AUJOURD'HUI

L'association Syndrome de Down avec la trisomie 21 a été découverte, par les docteurs Jerome Lejeune et Marthe Gauthier en 1959 (Lejeune, Gautier, & Turpin, 1959). La compréhension de l'origine génétique de ce syndrome a rendu obligatoire le dépistage pour les femmes à risque (RI < 1/250) et depuis les années 1980 l'encadrement des mères porteuses d'un fœtus trisomique permet le choix de la poursuite ou non de la grossesse, grâce notamment à la dépénalisation de l'avortement ou I.V.G. en 1975 (Simone Veil). Du fait de cette nouvelle option pour les futures mères, nous pouvons nous poser « la question est ce que le nombre d'enfants porteurs de la trisomie a diminué depuis cette loi de 1975 ? ». Le syndrome de Down n'est pas une maladie à proprement parler mais se décrit comme un état différent de la population générale du fait de la présence en 3 copies de ce chromosome 21. Nous pouvons guérir d'une maladie (même si certains remèdes n'existent pas encore) mais la guérison de la trisomie 21 n'est pas envisageable. La finalité de la recherche actuelle est de trouver des traitements pour améliorer la vie de ces personnes et de les intégrer sans discrimination dans la société.

Qu'en est-il de la prévalence de la trisomie 21 d'hier à aujourd'hui ? Exploitions ensemble les résultats du consortium EUROCAT (Conseil de surveillance européen des anomalies congénitales). Il réunit 22 pays de l'UE avec, pour la plupart, plusieurs villes recensées. Voici un bilan sur le nombre total d'anomalies congénitales sur les 30 dernières années (figure 4), ainsi qu'une comparaison sur les 5 dernières (figure 5).

| Anomaly | 1980-2010 | | | | |
|---------------|-----------|---------|------------|------------------|---------------------|
| | LB N | FD N | TOPFA N | LB+FD+TOPFA N | LB+FD+TOPFA Rate |
| All Anomalies | 299465 | 7938 | 50993 | 358396 | 233,81 |

| | | | | | |
|---------------------------------|-------|------|-------|--------|-------|
| Nervous system | 17756 | 2236 | 15719 | 35711 | 23,3 |
| Eye | 6761 | 148 | 465 | 7374 | 4,81 |
| Ear, face and neck | 6149 | 298 | 1014 | 7461 | 4,87 |
| Congenital heart defects | 93462 | 1895 | 7987 | 103344 | 71,33 |
| Respiratory | 6699 | 724 | 2096 | 9519 | 6,21 |
| Oro-facial clefts | 20268 | 500 | 1665 | 22433 | 14,64 |
| Digestive system | 26258 | 980 | 3308 | 30546 | 19,93 |
| Abdominal wall defects | 4579 | 525 | 2795 | 7899 | 5,15 |
| Urinary | 38452 | 1220 | 6283 | 45955 | 29,98 |
| Genital | 26405 | 350 | 1028 | 27783 | 18,13 |
| Limb | 61082 | 1423 | 5488 | 67993 | 44,36 |

Figure 4 Recensement des anomalies congénitales des pays membres de l'EUROCAT de 1980-2010 (LB= live births; FD= foetal deaths; TOPFA= termination of pregnancy for foetal anomaly / N= number of cases ; Rate per 10 000 births).

| Anomaly | 2005-2010 | | | | |
|---------------------------------|-----------|---------|------------|------------------|---------------------|
| | LB N | FD N | TOPFA N | LB+FD+TOPFA N | LB+FD+TOPFA Rate |
| All Anomalies | 92080 | 2098 | 18584 | 112762 | 253,27 |
| Nervous system | 5379 | 441 | 5208 | 11028 | 24,77 |
| Eye | 1696 | 13 | 116 | 1825 | 4,1 |
| Ear, face and neck | 835 | 25 | 216 | 1076 | 2,42 |
| Congenital heart defects | 31822 | 547 | 2814 | 35183 | 79,02 |
| Respiratory | 2038 | 148 | 636 | 2822 | 6,34 |
| Oro-facial clefts | 6013 | 89 | 577 | 6679 | 15 |
| Digestive system | 6622 | 189 | 939 | 7750 | 17,41 |
| Abdominal wall defects | 1681 | 133 | 1068 | 2882 | 6,47 |
| Urinary | 12847 | 265 | 1913 | 15025 | 33,75 |
| Genital | 9358 | 62 | 279 | 9699 | 21,78 |
| Limb | 16450 | 340 | 1723 | 18513 | 41,58 |

Figure 5 Recensement des anomalies congénitales des pays membres de l'EUROCAT de 2005-2010.

Premier constat, le recensement fait état de 16% de FD+TOPFA en 1980-2010 et de 18% sur les dernières années. Nous pouvons donc déjà dire que le nombre d'anomalies congénitales ne diminue pas depuis trente ans. Le facteur le plus notoire reste toujours les défauts cardiaques et les proportions restent sensiblement les mêmes sur ces trois dernières décennies. Le second constat porte sur le nombre de cas totaux recensés (par anomalie LB+FD+TOPFA) : 358 396 sur 30 ans, soit une moyenne de 11 561 cas/an ; en comparaison, sur la période 2005-2010 ont été comptabilisés 112 762 cas soit 18794 cas/an. D'une part nous pouvons comprendre que le nombre recensé augmente grâce

aux technologies actuelles qui permettent des dépistages de plus en plus précis et précoces, mais cela n'explique pas tout. L'augmentation de l'âge maternel surtout pour le 1^{er} enfant, et l'exposition à un environnement de plus en plus « contaminé » favorisent l'apparition d'anomalies congénitales. Qu'en est-il pour la trisomie 21 ? (figure 6)

| 1980-2010 | | | | | |
|--------------------|---------|---------|------------|------------------|---------------------|
| Anomaly | LB N | FD N | TOPFA N | LB+FD+TOPFA N | LB+FD+TOPFA Rate |
| Chromosomal | 23473 | 1907 | 23607 | 48987 | 31,96 |
| Down Syndrome | 15625 | 633 | 12514 | 28772 | 18,77 |
| 2005-2010 | | | | | |
| Chromosomal | 6696 | 669 | 9088 | 16453 | 36,95 |
| Down Syndrome | 4357 | 239 | 4877 | 9473 | 21,28 |

Figure 6 Recensement des anomalies chromosomiques / syndrome de Down des pays membres de l'EUROCAT de 1980-2010 et 2005-2010.

Les mêmes conclusions apparaissent quant à la prévalence du syndrome de Down en Europe, il y a une augmentation du nombre de cas recensés ces dernières années. Cette tendance européenne se reflète-elle en France ? Pour cela, nous avons observé cette prévalence au sein de deux grands centres nationaux que sont Strasbourg et Paris (figure 7).

| 1980-2010 (Strasbourg) | | | | | |
|---------------------------|---------|---------|------------|-----------------|---------------------|
| syndrome de Down recensés | LB N | FD N | TOPFA N | Population N | LB+FD+TOPFA Rate |
| Strasbourg (1980-2010) | 285 | 13 | 352 | 335962 | 19,35 |
| Strasbourg (2005-2010) | 27 | 3 | 83 | 39257 | 28,78 |
| Paris (1980-2010) | 921 | 65 | 2016 | 1005153 | 29,87 |
| Paris (2005-2010) | 137 | 8 | 552 | 161280 | 43 |

Figure 7 Recensement des cas de syndrome de Down dans les villes de Strasbourg et Paris de 1980-2010 et 2005-2010

La réponse est oui, la France suit la tendance européenne, et même plus... Dans le centre situé à l'Est de la France, le taux passe de 20 à 30 pour 10 000 sur les 5 dernières années, pour un peu plus de 300 000 naissances. La population passée au crible à Paris est trois fois plus importante, et dans leur cas est atteint un taux de 43 pour 10 000 naissances recensées. Paris est un des plus grands centres d'étude et de soins des enfants malades en Europe. Ce taux est quasiment 1,5 fois plus important que la moyenne des trois dernières décennies. Le syndrome de Down est donc plus que jamais un sujet d'actualité.

IV. LES RAISONS DE L'INCIDENCE

A. Age maternel

Comme énoncé dans le chapitre « Diagnostic de la Trisomie 21 », l'âge maternel est un facteur de risque. Avant de comprendre pourquoi, il est intéressant d'observer la variation temporelle du taux de fécondité en fonction de l'âge (figure 8) :

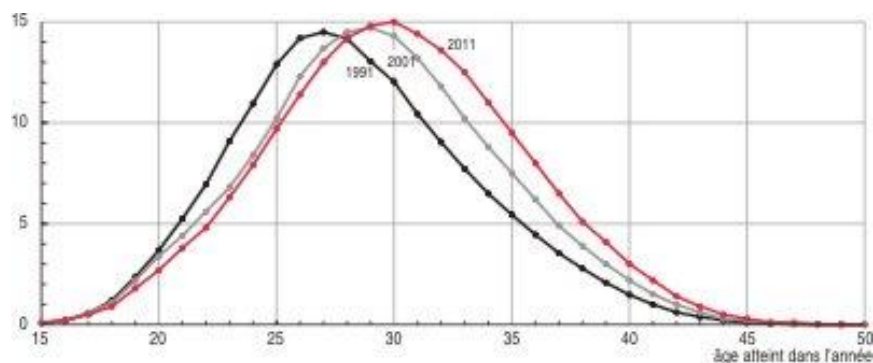


Figure 8 Nombres de naissances vivantes pour 100 femmes/âge (INSEE France - données estimation de population et statistiques de l'état civil).

En données chiffrées, le taux de fécondité des femmes de 15-24 ans passent de 3.4 en 2001 à 3.1 en 2011, quant aux femmes de 35-39 ans leur taux évolue de 5.1 à 6.5. L'âge devient donc un des facteurs les plus impactant sur le risque d'anomalies congénitales. Une revue de 2009 nous propose une hypothèse explicative, et non un constat : l'OMS (Oocyte Mosaicism Selection); en 2008, cette équipe avait déjà montré qu'il existerait un pool de follicules présentant des anomalies chromosomiques au moment de la formation des ovaires et qu'une proportion aléatoire persisterait

après l'atrésie (Hulten, 2008). Il propose donc l'hypothèse suivante : ce pool anormal qui a « survécu » ne va pas être sélectionné au cours de l'ovulation lors de chaque cycle menstruel et le nombre d'ovocytes va donc s'accumuler; au fur et à mesure de la diminution physiologique du lot d'ovocytes sains, le pool anormal va voir sa quantité proportionnellement augmentée (Figure 9). De ce fait, la probabilité d'avoir une ovulation aneuploïde augmente dans les dernières années précédant la ménopause.

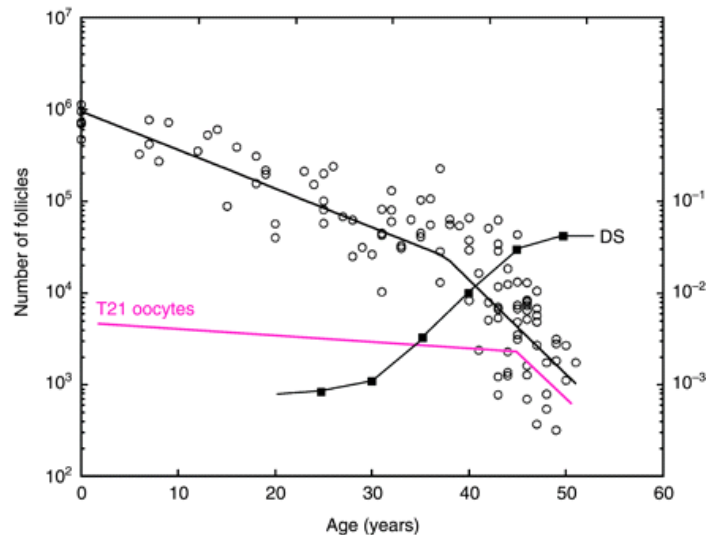


Figure 9 Augmentation de la proportion d'ovocytes T21 dans l'ovaire âgé. (Cercles noirs= nombre total d'ovocytes (axe y) en fonction de l'âge (axe x) ; ligne rose= nombre prédictifs d'ovocytes T21 de la naissance à la ménopause ; carrés noirs= l'incidence observée (axe y droit) de T21 selon l'étude de (C. R. Morris et al., 2012)).

B. Primiparité

En plus de l'âge maternel qui a un effet avéré sur l'incidence de la T21, la combinaison à la primiparité accroît cet effet. En effet, une étude récente de l'I.N.E.D. (G. Pison, 2009) a observé la proportion de l'âge maternel des grossesses du 1^{er} enfant par rapport à l'ensemble des naissances (figure 10). De 1900 à 1980, l'âge moyen a eu tendance à diminuer passant de 29 à moins de 27 ans, avec une primiparité stable aux alentours de 25 ans; depuis les années 2000, l'âge moyen du premier enfant est devenu supérieur à l'âge moyen de l'ensemble des naissances des années 70.

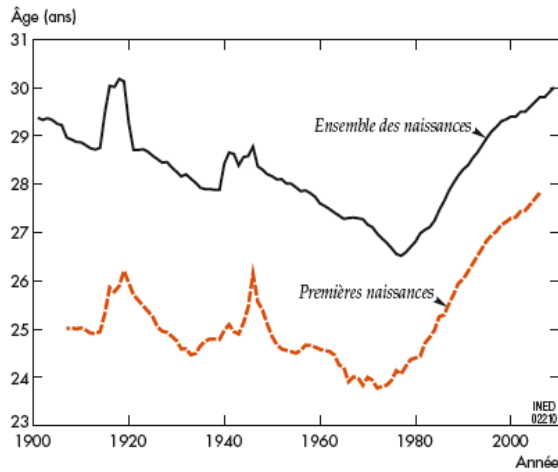


Figure 10 Evolution de l'âge moyen à la maternité en France depuis 1900

Après ces brèves analyses, nous ne pouvons pas expliquer 100% des phénomènes d'apparition de la trisomie 21 par la primiparité et la gamétogénèse ; la femme n'a pas totalement le contrôle du développement de son fœtus et elle subit, malheureusement, les aléas de son environnement.

C. Environnement

Depuis que l'homme exerce et influence son environnement, il produit des déchets. Le confort et l'argent ne sont pas des composants naturels de la condition humaine. Et comme pour le fonctionnement du corps humain, tout ce qui est étranger est détruit et rejeté à l'extérieur ; sauf que dans notre cas, il n'y a pas de barrière avec l'extérieur et après quelques milliers d'années d'exploitation de l'environnement, nous devons vivre avec nos propres déchets. Un des exemples les plus probants est l'action des déchets hormonaux sur la physiologie humaine. Le docteur Martinez-Frias a montré que la prise de pilules contraceptives pouvait influencer sur le risque de féconder un embryon aneuploïde. (M.L. Martinas-Frias *et al. Journal of perinatology* 2001).

| Table 1 Younger Mothers: Sample Size for Down Syndrome Cases and the Rest of Total Controls. Unadjusted and adjusted OR and 95% CI | | | | |
|--|--------------------------|---------------------|--------------------------|-------------------------|
| OCs | Mothers of Down syndrome | Mothers of controls | Unadjusted OR (95% CI) p | Adjusted* OR (95% CI) p |
| Non-exposed | 556 | 11,749 | — | — |
| Exposed | | | | |
| (A) Stopped after conception (months = 0) | 14 | 109 | 2.71 (1.48–4.89) 0.0003 | 2.77 (1.57–4.90) 0.0004 |
| (B) Stopped 1 month before conception | 43 | 861 | 1.06 (0.76–1.47) 0.74 | 1.11 (0.81–1.53) 0.52 |
| (C) Stopped 2 months before conception | 36 | 677 | 1.12 (0.78–1.61) 0.51 | 1.15 (0.81–1.63) 0.42 |
| (D) Stopped ≥3 months before conception | 119 | 2,138 | 1.18 (0.95–1.45) 0.11 | 1.15 (0.94–1.42) 0.17 |

CI = confidence limits.
*Controlling maternal age through a logistic regression analysis.

Figure 11 Influence de la prise de contraception orale (OC) sur l'incidence de la trisomie 21 chez les mères de moins de 35 ans.

Le résultat de son étude est peu rassurant ; en effet si l'arrêt des OCs n'a pas d'impact majeur chez les femmes âgées de plus de 35 ans, les hormones oestro-progestatives en ont un chez la jeune femme. Le risque est intensifié de 2,8 fois lorsque la fécondation a lieu alors que la mère prend encore la pilule.

Malgré la controverse autour de ce sujet délicat, j'ai choisi comme dernier exemple la catastrophe humainement provoquée la plus grave de l'histoire, sur le même plan que Fukushima en 2011, je veux évidemment parler l'accident nucléaire de Tchernobyl en 1986. Une équipe allemande a résumé ce dont l'Europe se doutait : les effets de la radioactivité sur la trisomie 21 (Sperling, Neitzel, & Scherb, 2012). Ils ont étudié la prévalence du syndrome dans les pays européens les plus proches de la centrale en janvier 1987, c'est-à-dire 9 mois après l'explosion du réacteur. L'apparition d'un pic est indiscutable dans les pays limitrophes et le long du déplacement du nuage : de la biélorusse, Pologne, Allemagne au nord-ouest de l'Angleterre (Figure 12). Sur ce graphe sont présentées les prévalences à court terme en Allemagne (Berlin Ouest) et une combinaison des différents pays étudiés. Mais ces effets peuvent avoir des répercussions à long terme si l'incorporation de nucléotides radioactifs a eu lieu jusque dans les cellules germinales des personnes affectée (Metneki & Czeizel, 2005).

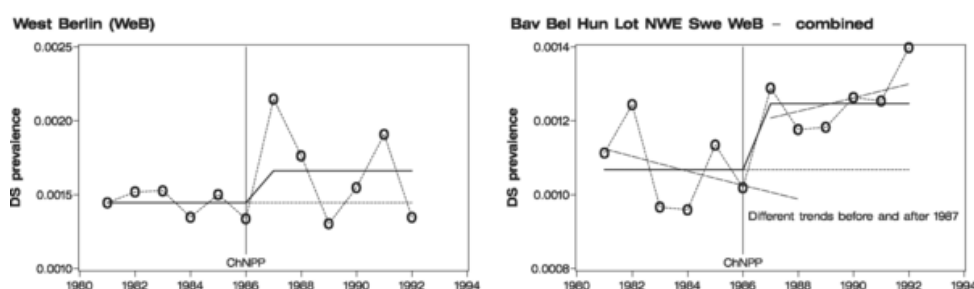


Figure 12 Prévalence des naissances annuelles de SD (au même âge maternel) à Berlin Ouest et dans les 7 régions combinées de l'étude (Allemagne, Ecosse, Angleterre, Hongrie, Pologne, Biélorussie et Suède) ; en ligne discontinue est représentée la prévalence observée et en ligne continue la prévalence théorique par extrapolation.

Même si l'impact est irréfutable comme le montre cette figure, une remarque est soulevée par les auteurs de l'étude quant à 2 pays inclus dans l'étude. En effet, l'Allemagne (ici Berlin) et la Biélorussie présentent un facteur spécifique pouvant discuter l'observation puisque c'est dans leurs régions que l'on mesure les plus hautes prévalences en termes de déficit en iode en Europe, et donc l'effet de la radioactivité a pu être excessivement amplifié dans ces régions comparées au reste du continent.

V. SIGNES CLINIQUES ET COGNITION

Le syndrome de Down est caractérisé par trois principaux phénotypes présents chez tous les cas diagnostiqués : la déficience intellectuelle, avec une pénétrance complète mais un degré de sévérité hétérogène, la dysmorphie faciale et l'hypotonie. C'est un syndrome très complexe puisqu'il affecte quasiment toutes les fonctions physiologiques humaines. Les autres phénotypes recensés affectent les sens (vision, audition) (Roizen, 2001), le cœur, les intestins (Dierssen et al., 2001), le système immunitaire, de la thyroïde, du squelette (Carmeli, 2002) et la fertilité (Stefanidis et al., 2011). L'incidence de ces phénotypes est reprise dans la figure 13, tiré de (Antonarakis et al., 2004).

| Phenotype | % in DS [Au: please explain] or fold increase in DS |
|----------------------------------|---|
| Mental retardation | 100% |
| Alzheimer disease neuropathology | 100% after 35 years |
| Muscle hypotonia | 100% |
| Characteristic dermatoglyphics | 85% |
| Short stature | 70% |
| Brachycephaly | 75% |
| Epicanthic folds | 60% |
| Iris Brushfield spots | 55% |
| Protruding tongue | 45% |
| Folded/dysplastic ear | 50% |
| Short, broad hands | 65% |
| Short fifth finger | 60% |
| Congenital heart defect | 40% |
| Atrioventricular canal | 16% |
| Duodenal stenosis/atresia | 250x |
| Imperforate anus | 50x |
| Hirschsprung disease | 30x |
| Acute megakaryocytic leukemia | 200-400x |
| Leukaemia (both ALL and AML) | 10-20x |

Figure 13 Fréquence d'association des phénotypes recensés dans le syndrome de Down

La plupart de ces phénotypes impactent sur la vie quotidienne des personnes SD, ce manuscrit de thèse va approfondir un de ces phénotypes, le plus distinctif du syndrome mais aussi le plus impactant: la déficience intellectuelle. Tout symptôme neurologique est très difficile à prendre en charge ; même si aujourd'hui la recherche a permis de comprendre nombre de mécanismes physiopathologiques cognitifs, le bénéfice sur les patients n'est pas encore au rendez-vous. Pour résumer, aujourd'hui on ne sait toujours pas comment soigner la déficience intellectuelle. C'est pourquoi la recherche préclinique, qui a pour but de découvrir des cibles thérapeutiques efficaces, représente une des voies les plus prometteuses, et donc indirectement des plus financées.

En soulignant que 100% des patients ont un retard mental détecté, cet écrit résumera l'ensemble des déficits cognitifs traduisant ce trouble ainsi que les complications neurologiques qui peuvent en découler et en s'appuyant sur les théories pertinentes des docteurs Lott et Dierssen (Lott &

Dierssen, 2010). Le syndrome de Down est caractérisé par des performances réduites en apprentissage, mémoire et langage qui, réunies, troublent à des degrés divers le fonctionnement intellectuel (M. Dierssen, Y. Herault, & X. Estivill, 2009).

A. Niveau cognitif:

La mémoire est une notion très abstraite et complexe qui se compose de catégories mnésiques distinctes et très spécifiques. Elles peuvent être synthétisées comme sur la figure 14 (www.human-memory-net).

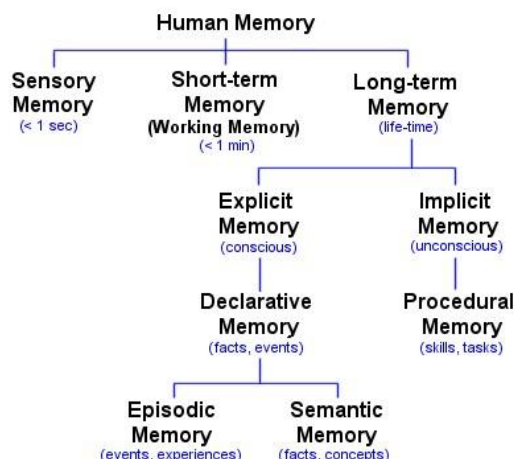


Figure 14 Les différents types de mémoires chez l'homme

La mémoire visuospatiale à court terme, la mémoire associative et la mémoire implicite à long terme semblent épargnées, mais la morphosyntaxe, c'est-à-dire l'analyse formelle et fonctionnelle des mots, la mémoire verbale à court terme et la mémoire explicite à long terme sont quant à elle le plus souvent altérées (Brown et al., 2003; Clark & Wilson, 2003). Chez les enfants SD, leurs progrès développementaux sont malheureusement entravés par leurs incapacités à travailler et à maintenir de nouvelles aptitudes, et par leurs approches contre-productives à apprendre de nouvelles activités (Gilmore & Cuskelly, 2009).

B. Niveau structurel:

Des observations post-mortem et volumétriques (IRM) ont montré que le volume total du cerveau des patients était réduit avec certaines régions disproportionnellement réduites comparativement à la population générale, notamment le cervelet, le cortex frontal et temporal et l'hippocampe (Kesslak, Nagata, Lott, & Nalcioglu, 1994; Smigielska-Kuzia et al., 2011). Il a été clairement établi qu'une microstructure hippocampique était responsable de symptômes cognitifs chez ces personnes, se traduisant par un déficit dans les tâches de stockage d'informations (Pennington,

Moon, Edgin, Stedron, & Nadel, 2003) ainsi que la mémoire épisodique, se traduisant par des difficultés dans le processus d'enregistrement/récupération de données (Carlesimo, Marotta, & Vicari, 1997). Historiquement, les différents types de mémoire sont tous associés plus ou moins directement à l'hippocampe ; aujourd'hui la capacité mnésique à court terme est associée à d'autres structures cérébrales reliées ou non à l'hippocampe. A ce titre, le cortex entorhinal, le cortex préfrontal, le striatum voire le cervelet interviennent dans la génération de ce souvenir. Cette dernière aire préférentiellement affiliée aux aptitudes locomotrices, est impliquée également dans l'apprentissage et la génération des mots (Konczak & Timmann, 2007). Le cervelet et ses connections externes avec le cortex et les composantes du système limbique serait donc un moteur essentiel de fonctions cognitives comme l'attention, la mémoire de travail, l'apprentissage du langage, le contrôle de l'exécution ou encore l'émotion (Strick, Dum, & Fiez, 2009).

Dans ce manuscrit, nous nous sommes principalement intéressés à l'organe cérébral central dans la construction de la mémoire : l'hippocampe (figure 15).

C. L'hippocampe

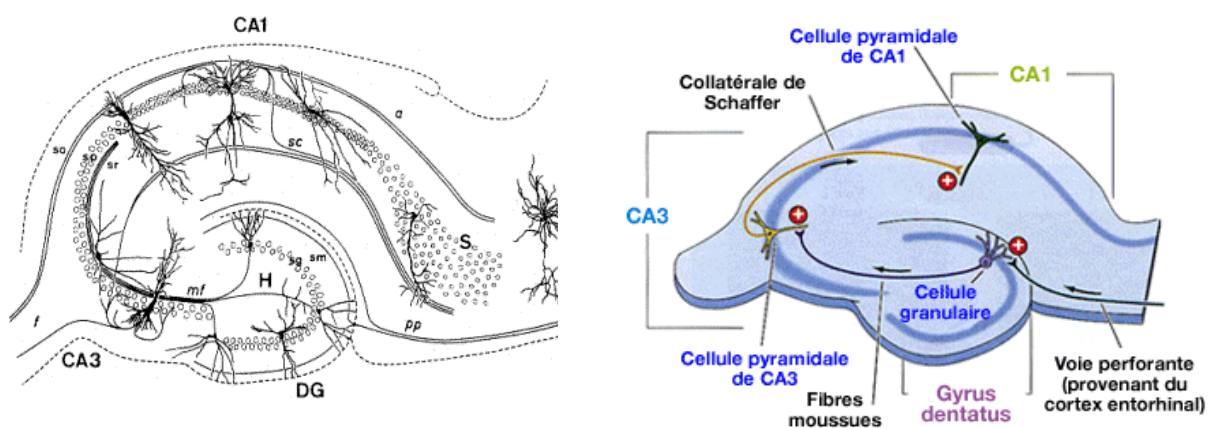


Figure 15 Organisation structurelle (à gauche) et fonctionnelle (à droite) de l'hippocampe.

Il est organisé en 3 principales régions : le Gyrus denté (DG), le CA1 et le CA3. Elles structurent le fonctionnement de l'hippocampe via la boucle trisynaptique. Cette boucle forme le circuit neuronal initial à l'activité mnésique se traduisant par des balances de phénomènes potentiateurs/dépresseurs au sein du tissu. L'hippocampe reçoit des influx nerveux externes d'aires très localisées provenant du tronc cérébral, mais surtout de l'hippocampe controlatéral et du cortex entorhinal. La voie trisynaptique a pour origine la voie perforante des axones du cortex entorhinal qui excitent les cellules granulaires du DG. L'information transformée par ces cellules est ensuite transférée aux cellules du CA3 via les axones que l'on appelle les

fibres moussues ; elle y est traitée et filtrée puis envoyée à travers les axones des collatérales de Schaffer jusqu'aux cellules pyramidales du CA1, dernière étape avant la distribution de l'influx nerveux aux noyaux centraux efférents. Cette hiérarchisation unique est aujourd'hui associée au terme récent de plasticité synaptique. Cette notion représente une sorte d'échelle fonctionnelle de l'efficacité de communications interneuronales. A chaque échelle son unité, si l'on peut dire, et celle de cette plasticité est ce que l'on nomme la LTP (Long Term Potentiation). Elle représente la mesure électrophysiologique de l'intensité du message nerveux entre 2 populations de neurones. En stimulant électriquement les axones d'un ensemble de neurones, il peut être mesuré la réponse électrophysiologique de la population neuronale réceptrice du message nerveux. Cette réponse, traduite par des variations de flux ioniques, génère un nouveau message nerveux électrique qui est nommé LTP (Cramer,, 2012)

D. LTP et plasticité synaptique

De nombreuses recherches ont prouvées qu'une activation, positive (LTP) ou négative (LTD), à long terme de synapses fonctionnelles est la base du processus mnésique de l'hippocampe (**publi**). Par conséquent, en plus des modifications de volume cérébral, des altérations de ces connectivités synaptiques complémenteraient les raisons des troubles cognitifs des patients. Des tests spécifiques sur l'utilisation de la mémoire spatiale hippocampe-dépendante montrent une performance diminuée chez les personnes SD (Pennington et al., 2003). Comme pour l'étude volumétrique, des études post-mortem ont été réalisées sur des individus SD pour observer à plus petite échelle. Il a été trouvé une significative diminution de la densité neuronale et dendritique, différence apparaissant dès la neurogenèse *in utero* (entre 17 et 21 semaines de gestation) (Guidi et al., 2008). A la naissance, les bébés SD présentent des défauts de myélinisation avec persistance de la densité réduite à laquelle s'ajoute une morphologie neuronale anormale. Au cours des premières années de la vie, les expansions dendritiques se raccourcissent de façon trop prononcée, le nombre et la forme des épines dendritiques deviennent inconstants et la synaptogenèse devient déficitaire (Becker, 1991). Toutes ces altérations accumulées au moment le plus critique de la vie vont malheureusement se maintenir pendant la vie adulte.

E. Autres troubles neurologiques

Outre les pertes cognitives précédentes, d'autres symptômes s'ajoutent ; les patients SD présentent un risque épileptique plus élevé que la population générale, à certaines périodes de leurs vies. En effet, le recensement de ces crises montre un nombre élevé de cas autour de la première année de naissance (40%). Les enfants touchés par ces accidents au début de leur vie voient leur troubles cognitifs aggravés par la suite (Pueschel, Louis, & McKnight, 1991). La plupart des personnes SD répertoriées comme épileptiques développeront précocement (vers 45 ans) des démences de type Alzheimer (Menendez, 2005).

Les individus SD développent aussi prématurément des troubles du sommeil (apnées) avant 5 ans, ceci lié à leur morphologie faciale singulière (Shott et al., 2006). Ils présentent aussi des troubles otiques, visuels (strabisme, cataracte, glaucome), un hypothyroïdisme congénital (10%). Ces personnes sont également affectées de troubles vasculaires augmentant le risque d'AVC.

L'ensemble de ces problèmes neurologiques intensifient les problèmes intellectuels des individus, en handicapant davantage leur langage et communication déjà affaiblie. L'évolution de ces facteurs n'est aujourd'hui pas favorable, et les déficits présents seront amplifiés amplifiés lorsque ces personnes vieilliront...

VI. VIEILLISSEMENT ET FIN DE VIE DANS LE SYNDROME DE DOWN

L'évolution favorable de l'espérance de vie atteint toute les populations des pays ayant les moyens de fournir un système de santé efficient. Le cas pour les personnes porteuses de la trisomie 21 y est intégré. Cependant, les conditions de vie vont être différentes car les personnes SD sont affectées d'un vieillissement précoce (Bittles, Bower, Hussain, & Glasson, 2007). Sur le dernier siècle, l'espérance de vie a été multiplié par 5 chez ces personnes, qui vivaient en moyenne jusqu'à 9-11 ans en 1900, et qui aujourd'hui atteignent aisément les 50 ans. Mais il y a un retour négatif à cela, le processus de vieillissement est accéléré et les déficits fonctionnels et cognitifs sont amplifiés, passée la cinquantaine, par rapport à la population générale (Esbensen, Seltzer, & Krauss, 2008). Dans l'étude de Farriols-Danes a été dressé un tableau clinique des différentes pathologies affectant des personnes SD de plus de 50 ans comparées à des personnes plus jeunes. Il apparait clairement que les maladies

neurologiques représentent la catégorie la plus touchée, déjà dans la population SD jeune, mais surtout dans la population vieillissante. Dans quelle proportion cette précipitation dans le déclin de la fin de vie de ces individus se fait-elle ? L'équipe espagnole du centre médical de la fondation catalane du syndrome de Down nous propose une explication point par point (Farriols-Danes *et al. International Medical Review on Down Syndrome* 2010) :

- La démence : l'apparition précoce de type Alzheimer a une origine génétique, puisque le gène *App*, entre autres, se situe sur le chromosome 21. Dès 40 ans, 80% des individus SD présentent des caractéristiques typiques de l'Alzheimer et après 60 ans, 60% sont diagnostiqués avec une démence. La difficulté des médecins réside dans l'étape du diagnostic, dans le fait de pouvoir différencier ce critère des autres troubles cognitifs déjà présents. De plus, l'impact de la protéine APP semble être très localisé dans le développement de la démence puisqu'une étude a montré que le taux plasmatique des protéines amyloïdes ne varient pas significativement avec l'âge, rendant encore plus délicat le dépistage (E. L. Jones, Hanney, Francis, & Ballard, 2009).

- La vue : les symptômes plus observés sont des problèmes de cataractes, de strabisme ou encore de réfraction ; une partie de ces phénotypes pourraient également être expliquée par des mécanismes de la maladie d'Alzheimer (Moncaster *et al.*, 2010). Néanmoins ce sont des troubles que l'on retrouve dans le vieillissement de la population générale.

- L'ouïe : les personnes SD développent une surdité précoce 30 ans en moyenne plus tôt que la population générale. Après 50 ans, 70% des individus sont touchés (préférentiellement les hautes fréquences) dont 13% à un stade sévère. Cette perte est due à une diminution des afférences sensorielles ; elle explique en partie l'isolation sociale et le manque de stimulation cognitive des patients qui ne parviennent pas à détecter la totalité de l'information verbale d'une discussion.

- La peau : Apparition prématurée du grisonnement des cheveux, de l'alopecie et des rides.

- L'épilepsie : 24 à 28% des personnes SD sont affectées par des crises convulsives après 50 ans (Lott *et al.*, 2012).

- Hypothyroïdisme : 30-40% des individus présentent un dysfonctionnement de la glande, avec 7-8% souffrant d'un hypothyroïdisme sévère (Prasher & Gomez, 2007) ; (Prasher, Ninan, & Haque, 2011); ce dernier peut expliquer l'accélération des pertes cognitives après 50 ans.

○ Le cœur : environ 50% des personnes T21 souffrent d'une usure de la valve mitrale qui se traduit par un prolapsus. Ce cas est associé au vieillissement et indépendant des défauts cardiaques congénitaux.

D'autres troubles sont encore décrits tels que l'obésité, la dépression, des apnées du sommeil ou une ménopause prématurée. Tous ces troubles vont inexorablement dégrader la vie de ces personnes ; quels sont ceux qui leur sont fatals ? Commençons par la répartition des causes de décès après 65 ans dans la population générale : 5% de mort violente, 30% de maladies cardiovasculaires, 28% de cancers, 20% de pathologies neurodégénératives/pulmonaires/digestives, et 17% d'autres causes (anomalies congénitales etc...). Chez les patients SD, l'ordre change sensiblement : les premières causes de décès sont les infections respiratoires, particulièrement la pneumonie (40%), viennent ensuite les maladies coronariennes (10%), insuffisances cardiaques, rénales et respiratoires (9%) et enfin les accidents vasculaires cérébraux (5%). Les principaux signes prédictifs de la fin de vie sont, en plus de l'âge, la détérioration des fonctions physiologiques et les changements comportementaux.

VII. RELATION GENOTYPE-PHENOTYPE CHEZ LES PATIENTS

A la fin des années 90, Delabar et son équipe ont émis l'hypothèse d'une région critique suffisante pour induire la totalité des phénotypes de la trisomie 21. En comparant une cohorte de patients à l'aide de marqueurs génétiques, ils ont ressorti 2 profils de 2 patients possédant une duplication partielle dans la partie proximale 21q22.3 qu'ils nommèrent D21S55 (Rahmani et al., 1989). Ces patients récapitulaient plus de 10 symptômes de la trisomie 21. Quelques années plus tard, une étude datant de 1994 s'est appuyée sur une comparaison des signes cliniques de plusieurs patients atteints de trisomies partielles du chromosome 21 (Korenberg et al., 1994). En comparant les 16 patients présentant des duplications (ou tétrasomie) segmentaires de cette petite cohorte, ils ont conclu que cette région D21S55 n'était pas suffisante pour reprendre tous les phénotypes ; ils opteraient pour une hypothèse de régions associées à des « fonctions phénotypes », comme par exemple des groupes de gènes liés spécifiquement aux phénotypes gastro-intestinaux ou aux défauts cardiaques. Plus récemment (2009), les équipes de Korenberg et Antonarakis ont poursuivi les comparaisons de patients avec des techniques beaucoup plus efficaces et précises notamment

avec la « Comparative Genomic Hybridization array» qui permet de comparer de manière très détaillée les séquences d'ADN génomique de plusieurs individus. Grâce à cette technique, les régions géniques ont été plus finement délimitées, permettant ainsi d'exclure/inclure certains gènes à certains phénotypes (Korbel et al., 2009). De la même manière, l'équipe d'Antonarakis a analysé sous 3 dimensions le génome d'une trentaine de patients : ils ont ainsi pu établir des liens entre les trisomies partielles finement délimitées et la présence de phénotypes : de nouvelles cartographies géniques ont été extraites affinant les régions candidates aux symptômes du syndrome de Down (Lyle et al., 2009).

Nos connaissances sur la physiopathologie humaine du SD s'accroissent de jour en jour, mais les pistes thérapeutiques sont cependant encore trop limitées. La difficulté principale dans l'étude d'une pathologie humaine réside en 1er lieu en la cible elle-même. Il est difficile de comprendre le ressenti des patients de par leur langage emprunté, de leur faire réaliser des tests psychomoteurs du fait du manque de communication restreint par le handicap et il est encore plus difficile de prélever des échantillons sur une personne humaine, surtout lorsque l'on souhaite étudier le cerveau ! C'est pourquoi les équipes de recherche se sont intéressées à la mise en place de modèles biologiques pouvant servir de support à l'étude de la trisomie 21. Il a été choisi le modèle rongeur, et spécifiquement la souris *Mus musculus* pour étudier la pathogénicité du syndrome de Down. Voici des éléments descriptifs qui appuient et confirment ce choix.

VIII. Modèles murins du syndrome de Down

A. Le chromosome 21

Le chromosome 21 fait parti de la famille des chromosomes acrocentriques, il est le plus petit représentant. Comme le montre la figure, la plupart des gènes se retrouvent sur le bras long. Le séquençage de ce chromosome fut un des résultats les plus attendus du consortium « Human Genome Project » du fait de son implication dans le syndrome de Down. La cartographie complète fut publiée en 2000 (Hattori et al., 2000). Il a été décrypté pas moins de 225 gènes au moment du séquençage, plus 8 nouveaux depuis 2000, 150 pseudogènes et un nombre très important de petits ARN non codants (69) représentés essentiellement par des miRNA, snRNA(nucléaires) et snoRNA(nucléolaires).

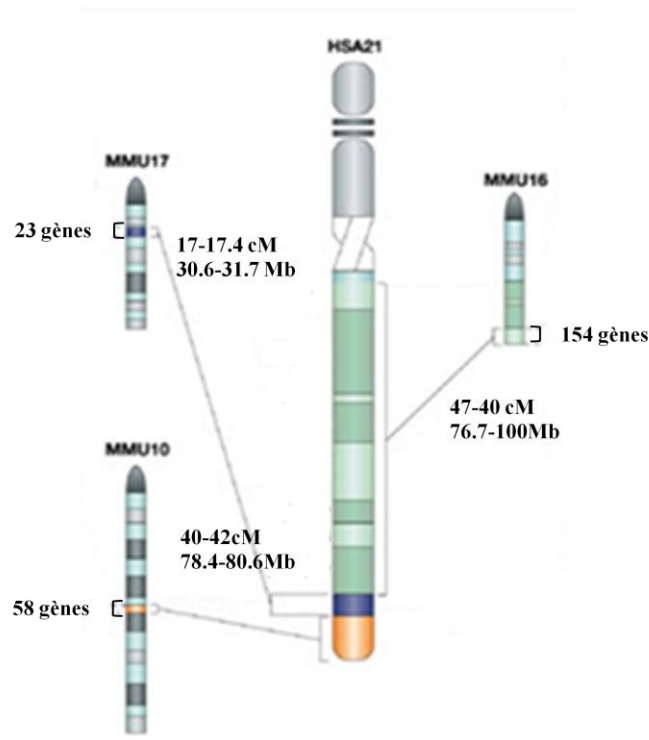


Figure 16 Représentation des régions synténiques entre le chromosome humain 21 Hsa21 et les chromosomes souris Mmu10, 16 et 17 (Antonarakis et al., 2004).

Parmi les espèces mammifères présentant des homologies génétiques avec l'Homme, la souris est ressortie comme le modèle de choix. Les gènes murins retrouvent un homologue humain dans 80% cas distribués sur 217 régions de synténie, avec 99% d'homologie de séquence. Concernant la trisomie 21, la quasi-totalité du bras long du chromosome 21 humain (*Hsa21*) se retrouve sur 3 chromosomes murins : le chromosome 10 (*Mmu10*), *Mmu16* et *Mmu17* (figure 16). Ces 3 régions rassemblent 225 gènes orthologues avec le même ordre d'apparition et la même orientation des séquences codantes. La plus grande région se situe sur le chromosome 16 (166 gènes), suivie par celle du chromosome 10 (47) et la région du 17 (23). L'autre point notable est que la plupart des gènes codants se situent sur la partie distale du chromosome, ce qui définit plus précisément les régions d'intérêt. Compte tenu de ces proximités génétiques, des analogies dans le développement embryonnaire des deux espèces et, principalement, de l'accessibilité à manipuler le génome murin, des équipes de recherche,

dont celle de Yann Hérault, ont décidé de créer des modèles transgéniques murins de la trisomie 21.

B. Les modèles animaux

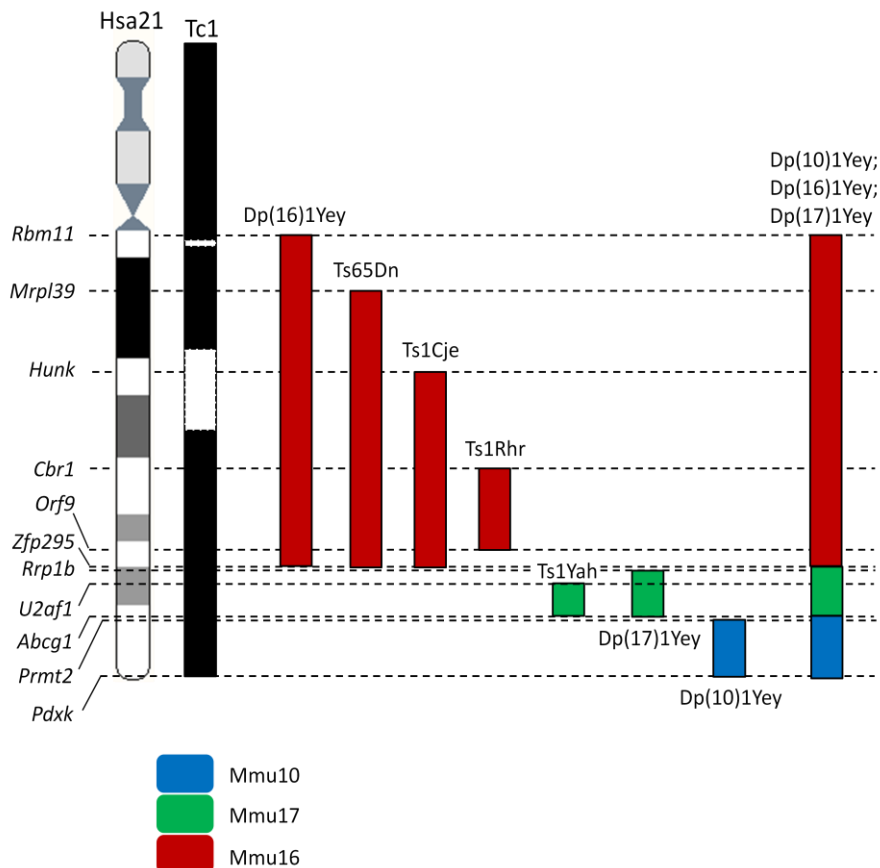


Figure 17 Schémas des principaux modèles murins de trisomies partielles créés au niveau des 3 régions de synténie.

Cette figure regroupe l'ensemble des modèles trisomiques disponibles pour la communauté scientifique. Ces modèles sont apparus suite à différents types de manipulations cellulaires, soit par traitement radioactif (Ts65Dn, Ts1Cje), manipulation nucléaire (Tc1) ou par recombinaisons homologues (Ts1Yah, Dp(N)Yey). Je vais décrire dans les paragraphes suivants les modèles de référence, Ts65Dn et Tc1, qui récapitulent le plus de phénotypes du SD ; le modèle Ts1Rhr qui présente une duplication de la région dite « critique » du syndrome de Down ; et enfin les modèles ciblant la région Mmu17 qui est le centre d'intérêt de mes travaux. J'exclue volontairement certains modèles très intéressants comme le modèle Ts1Cje, ce modèle ne démontrant malheureusement pas de défaut de mémorisation en reconnaissance

d'objets (Sago et al., 1998). Je ne discuterai pas plus du modèle de trisomie murine complète, créé par l'équipe de Yu (Yu, Li, et al., 2010), qui reprend les phénotypes combinés des souris Tc1 et Ts65Dn (pour ceux décrits dans la publication de référence), mais qui reste un modèle très difficile à établir et à maintenir à l'état complet pour étudier d'importantes cohortes. Voici donc les modèles de référence dans l'étude de la trisomie 21 :

1. Ts65Dn

Historiquement, c'est le deuxième modèle publié mais il est établi comme le modèle de référence dans l'étude du syndrome de Down. Il n'est pas apparu par un design précis d'une expérience visant à cibler une région précise, comme souvent dans la recherche, mais à la suite d'un processus d'irradiation pour engendrer des mutations aléatoires. Un phénomène rare s'est produit : une cassure a eu lieu au niveau de l'extrémité télomérique du chromosome 16 qui, par translocation réciproque, s'est attaché au centromère du *Mmu17*. Muriel Davisson va publier cette découverte fortuite et lancer l'étude de la trisomie 21 chez la souris (Davisson *et al.* 1993) ; (Reeves et al., 1995). Les premiers effets de cette trisomie sont observés dès la naissance puisque la répartition des génotypes ne suit pas la loi mendélienne : il existe une létalité postnatale qui touche les animaux porteurs du mini chromosome. Cette mort prématurée s'explique grandement par la présence d'anomalies cardiovasculaires d'ordre physique (Moore, 2006). Les individus vivant jusqu'à l'âge adulte montrent d'importants phénotypes associés au SD comme un retard de développement (poids et taille), des anomalies craniofaciales (Hill, Reeves, & Richtsmeier, 2007; Richtsmeier, Zumwalt, Carlson, Epstein, & Reeves, 2002). L'adulte est aussi touché par des anomalies cardiovasculaires non létales (Moore, 2006) mais surtout, il a été montré récemment des troubles d'ordre électrophysiologique (Raveau, Lignon, Nalesso, Duchon, Groner, Sharp, Dembele, Brault, & Herault, 2012). Le cœur des souris Ts65Dn présente un défaut de conductance de l'influx nerveux qui induit des asynchronismes de la rythmicité cardiaque. Les causes ne sont pas encore clairement établies mais la piste de la communication ionique intercellulaire serait mise en cause. Ces animaux présentent aussi une résistance accrue au développement tumoral grâce à un meilleur contrôle de l'angiogenèse lors du développement de certaines tumeurs (Minami et al., 2004).

Les souris présentent aussi et surtout des déficits cognitifs ; tout d'abord en terme de mémoire et d'apprentissage à travers les tests en piscine de Morris (Holtzman et al., 1996; Reeves et al., 1995; Sago et al., 2000; Stasko & Costa, 2004). Lors de ces tests, les animaux trisomiques mettent plus de temps à trouver la plateforme cachée de par la mise en place de stratégies de recherche moins performantes que les souris sauvages. Leurs performances s'avèrent également médiocres dans les tests spatiaux comme le labyrinthe radiaire (Demas, Nelson, Krueger, & Yarowsky, 1996; Demas, Nelson, Krueger, & Yarowsky, 1998) où le nombre de visites de bras déjà exploré est supérieur aux sauvages, et bien d'autres examens très bien recensés dans l'article du Dr Sérégaza (Seregaza, Roubertoux, Jamon, & Soumireu-Mourat, 2006). Les études comportementales ont été les précurseurs de l'instauration de la souris Ts65Dn comme modèle de référence. A l'heure actuelle, les études sont passées au stade cellulaire où l'exploration neuroelectrophysiologique de la souris a confirmé d'autres évidences et comparaisons avec les patients SD.

Une exploration tissulaire du cerveau des souris trisomiques a révélé des différences de densité neuronale dans plusieurs noyaux centraux comme l'hippocampe et le cortex, mais aussi dans la répartition synaptique (Belichenko et al., 2004; Kleschevnikov, Belichenko, Villar, et al., 2004). Ces déficits ne sont pas en adéquation avec une homéostasie de la plasticité synaptique et interfèrent avec la fonction neuronale (Cramer *et al.* 2012). L'enregistrement electrophysiologique de l'activité de l'hippocampe des souris Ts65Dn montre un défaut dans l'induction de la LTP hippocampique au niveau du CA1 et gyrus denté (Kleschevnikov, Belichenko, Epstein, et al., 2004; Kleschevnikov, Belichenko, Villar, et al., 2004). Tous ces défauts neurologiques tentent d'être comblés par des essais pharmacologiques avec en tête de file les antagonistes ou inverse-agonistes GABA. Les tests chez la souris montrent des résultats très encourageants au cours du blocage permanent ou non des récepteurs GABA par ces molécules, où l'on observe une restauration, l'activité LTP *in vivo* ; l'activité neuronale rétablie, les performances cognitives retrouvent elles aussi un niveau comparable aux souris sauvages (Braudeau, Delatour, et al., 2011; Kleschevnikov, Belichenko, Faizi, et al., 2012; Kleschevnikov, Belichenko, Gall, et al., 2012).

Ces souris présentaient initialement une trisomie partielle allant du gène *Mrpl39* au gène *Zfp295*. Cependant, en 2011, l'équipe de Y. Hérault avec celle de M. Davisson a déterminé la séquence du (des) point de cassure qui composent le mini chromosome (Duchon, Raveau, et al., 2011). Il en résulte la découverte d'une proportion non négligeable de gènes non homologues *Hsa21* situé entre le centromère et la portion du *Mmu17*. Ces derniers, au

nombre de 60, sont localisés sur le chromosome *Mmu17* et pourraient donc prendre part à l'apparition des phénotypes. Cette étude ne remet pas en cause l'utilisation du modèle mais oriente la réflexion sur l'utilisation des molécules thérapeutiques et le réel impact génétique.

2. Ts1Rhr

La plupart des phénotypes du SD étant récapitulés chez les souris Ts65Dn, il a été émis la même hypothèse selon laquelle cette région critique existerait chez la souris (Delabar et al., 1993). Elle contient une quarantaine de gènes dont plusieurs ont un rôle clé dans des fonctions cognitives, comme par exemple *Dopey 2* (Rachidi, Delezoide, Delabar, & Lopes, 2009), *Dyrk1a* (Dierssen et al., 2001) ou *Bace2* ; d'autres gènes sont affiliés à plusieurs traits (neurologique et craniofacial) avec *Ets2* (Sumarsono et al., 1996; Wolvetang et al., 2003). Enfin des gènes sont tributaires de la fonction cardiaque comme *Kcnj6* (Lignon et al., 2008). Des souris ont été créées pour modéliser cette DSCR sous forme de monosomie et trisomie afin de comprendre l'effet de dose des gènes de la région. Après des analyses comportementales et neurologiques de ces souris, l'équipe du Dr Reeves a prouvé que cette région était nécessaire mais pas suffisante pour exprimer l'ensemble des phénotypes (Olson, Richtsmeier, Leszl, & Reeves, 2004; Olson et al., 2007). Cette insuffisance est notamment révélée par l'absence de mortalité embryonnaire, potentiellement due à une diminution du nombre d'anomalies cardiaques.

3. Tc1

Ce modèle est une autre référence dans l'étude de la T21, puisque c'est le seul modèle chimérique souris/humain : l'équipe du Dr Fisher a créé par la technique « X irradiation Microcell Mediated Chromosome Transfert » (Dowdy, Scanlon, Fasching, Casey, & Stanbridge, 1990) un modèle souris contenant une copie de chromosome 21 humain. L'efficacité du modèle pouvait être envisagée puisque l'homologie de séquence des gènes du Hsa21 et des chromosomes murins est supérieure à 80%. Les premières études ont montré que de nombreux phénotypes étaient retrouvés notamment au niveau cérébral, avec un défaut de mémoire visuelle en test de reconnaissance d'objets, associé à une LTP réduite dans l'hippocampe (Morice et al., 2008; O'Doherty et al., 2005b). Les souris Tc1 sont également déficitaires dans les tests de mémoire de travail en piscine de Morris (Morice et al., 2008) ;

elles sont aussi affectées de défauts cardiaques histologiques ; cependant ces souris ne présentent pas de défaut en mémoire spatiale de référence, mémoire associative, ni de malformation au niveau craniofacial. Le défaut de mémoire visuelle s'avère partiel puisque seule la mémoire à court terme est touchée, pas la mémoire à long terme (puisque les souris Tc1 différencient les objets après une rétention de 24h) (Morice et al., 2008). Ces animaux modèles présentent par ailleurs des déficits locomoteurs affectant la coordination et l'apprentissage locomoteur (Galante et al., 2009).

Un phénotype inattendu a aussi été exploré chez ces souris : il semblerait qu'elles aient une propriété protectrice contre les tumeurs solides, particulièrement à travers la voie activatrice VEGF (Reynolds et al., 2010). Dans cette dernière étude du modèle une critique, non sans conséquence, est soulevée sur ce modèle. Même s'il reprend les phénotypes les plus importants dans le syndrome de Down, certains phénotypes cognitifs ne sont que partiellement exprimés, et ceci pour s'expliquer par l'absence de la région DSCR en trois copies.(Reynolds et al., 2010) .

4. Modèles impliquant le Mmu17 : Ts1Yah/Ms2Yah et Dp(17)Yey

Le modèle Ts1Yah est le premier modèle souris s'intéressant à la région synténique du Mmu17. Il contient une duplication en tandem de la région *Abcg1-U2af1* ; le modèle complémentaire Ms2Yah correspondant à une monosomie de la région fut créé en même temps mais n'a pas encore été étudié à ce jour. Ces souris trisomiques ont subi la même batterie comportementale que les modèles précédents et manifestent des phénotypes tout aussi intéressants.

L'absence de la trisomie du *Mmu16* et *10* a fait perdre les phénotypes cardiaques, craniofaciaux, et locomoteurs. Néanmoins, des symptômes de la T21 se retrouvent au niveau cognitif. Ces souris présentent un déficit de mémoire de travail à court terme dans le test de labyrinthe en Y et dans l'activité exploratoire en champ ouvert; elles sont également impactées dans la mémorisation visuelle dans le test de reconnaissance d'objets, associée encore une fois à un défaut de LTP. Mais ici, contrairement à tous les connus, la stimulation *in vivo* des souris conduit à une hyperactivation de la plasticité synaptique qui se maintient au cours du temps. Par ailleurs, les souris réussissent plus rapidement l'exercice que des souris

sauvages dans le test spatial en piscine de Morris, traduisant une meilleure mémoire de référence dans le modèle transgénique (Pereira et al., 2009).

Une seconde équipe a créé un modèle comparable de trisomie partielle de la région du chromosome 17 (Yu, Li, et al., 2010). Ces souris ne confirment pas le phénotype de mémoire spatiale de référence en MWM, mais corroborent les résultats expérimentaux sur la LTP (Yu, Liu, et al., 2010). Néanmoins, la région dupliquée sur un des chromosomes est légèrement différente du modèle Ts1Yah puisqu'elle contient un intervalle plus grand sur la région synténique : *Abcg1-Rp1b*.

5. Les gènes de l'intervalle *Abcg1-U2af1*

La région du chromosome 17 murin a été très peu étudiée dans le cadre du syndrome de Down. Ce n'est qu'à partir de 2009 que des modèles souris ont été modélisés afin de décrypter l'impact de cet intervalle dans le tableau phénotypique complexe. Ce manuscrit s'intéressera particulièrement au premier modèle publié Ts1Yah, lequel reflète quelques déficits cognitifs majeurs de la trisomie (Pereira et al., 2009). Ce modèle se caractérise donc par une triplication de la région *Abcg1-U2af1*, les gènes bordant étant présent seulement en deux copies. Voici une description de l'ensemble des gènes, avec potentiellement des candidats aux phénotypes.

a) Les gènes *Trefoil factor (Tff)*

Cette famille de trois gènes est exprimée au niveau du système gastro-intestinal. Ils participent au remodelage de la muqueuse de l'épithélium, de manière très active dans les cas pathologiques comme la maladie de Crohn ou les rectocoliques hémorragiques. Ces gènes sont ciblés comme potentiellement thérapeutiques dans les cancers gastriques et intestinaux pour régénérer la muqueuse détruite par la chimiothérapie (Hernandez et al., 2009).

b) Le gène *Tmprss3*

Ce gène s'exprime dans l'oreille interne chez le fœtus, et pourrait être impliqué dans le développement de la cochlée (Scott et al., 2001). Plus récemment, il a été démontré que *Tmprss3* était indispensable à la survie des cils des cellules de la cochlée (Fasquelle et al., 2011).

c) Le gène Pknox1

Ce gène fait partie de la grande famille des gènes homéobox. Il est indispensable au développement embryonnaire chez les mammifères. Il régule l'activité de la protéine PBX, qui intervient dans l'organogénèse. Un K.O. du gène chez la souris entraîne une létalité embryonnaire entre 17,5 jours après la fécondation (dpc) et la naissance. Les fœtus observés possèdent des œdèmes dans 67% des cas, un retard de croissance, des défauts de formation des yeux et des hémorragies (M. T. Ferretti et al., 2011).

d) Le gène Ndufv3

Ce gène code pour une enzyme déshydrogénase mitochondriale. Cette protéine n'a pas de rôle proprement attribué, mais les protéines de sa famille (Nduf) pourraient contribuer à l'apparition de symptômes dépressifs et de troubles bipolaires (Ben-Shachar & Karry, 2008). Il a été récemment montré que l'expression des gènes du complexe I mitochondrial, dont ce gène fait partie, varie de manière significative au cours du développement embryonnaire et post natal du cerveau chez la souris, notamment l'hippocampe (Wirtz & Schuelke, 2011).

e) Le gène Pde9a

La PDE9 est un membre de la famille des phosphodiésterases, et la sous-unité A est spécifiquement exprimée dans l'hippocampe. Un travail récent a démontré qu'une inhibition de cette protéine avait un impact sur le développement de la LTP *in vitro* (Kroker et al., 2012). Cette équipe a décrit le rôle électrophysiologique de la protéine sur l'induction de la synthèse protéique LTP-dépendante. Le blocage de l'activité de la PDE9A augmente la LTP précoce après stimulation. Ils ont observé des effets similaires en utilisant des inhibiteurs de la LTP tardive combinés à l'inhibiteur de la PDE9A. Tous les résultats concordaient pour impliquer cette phosphodiésterase dans la synthèse de protéines précoces et tardives nécessaires à la plasticité synaptique de l'hippocampe. Une autre étude a exploré les effets

potentiels au niveau cellulaire et prouvé que la PDE9A jouait un rôle dans l'activité synaptique via la voie GMPc(Bales, Plath, Svenstrup, & Menniti, 2010).

6. Le gène *Cbs*

a) Biochimie et fonction

Le gène *Cbs* code pour la protéine cystathionine beta synthase. Cette enzyme intervient dans la régulation du cycle de la méthionine et prend en charge la dégradation de l'homocystéine en cystathionine (Huang, Wahlqvist, & Li, 2010). Outre le maintien du taux d'homocystéine dans la cellule, elle régule indirectement un grand nombre de voies métaboliques indispensables à l'homéostasie cellulaire (figure 18).

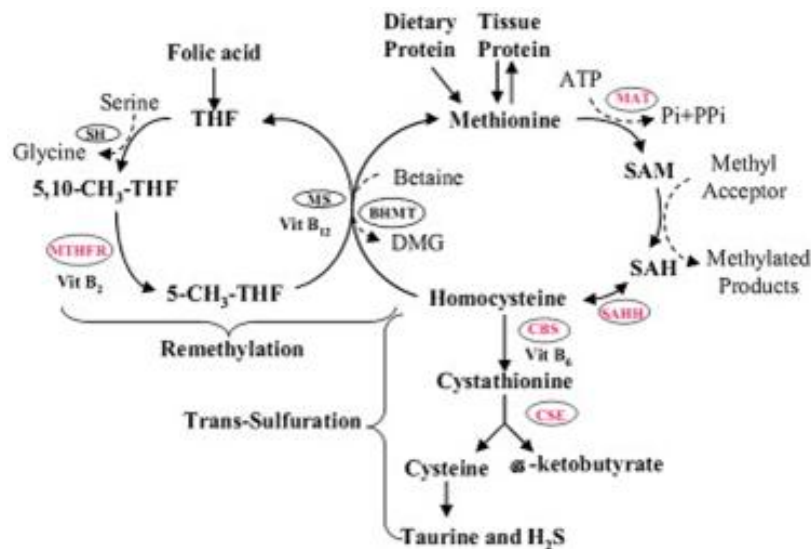


Figure 18 Cycle de la méthionine et ses voies métaboliques interconnectées (Huang 2010).

Le maintien d'une production continue de méthionine chez l'homme est indispensable à la synthèse des protéines. S'y ajoute la nature de cette molécule : la méthionine est un acide aminé essentiel, c'est-à-dire qu'elle doit nécessairement être apportée à la cellule, celle-ci étant incapable d'en synthétiser une quantité suffisante.

Dans le cycle de la méthionine apparaît également l'enzyme S-adenosylméthionine (SAM) ; cet enzyme a pour rôle de transférer des résidus méthyles sur des molécules accepteurs. Elle intervient généralement au niveau de l'ADN en servant de substrat aux ADN/histones méthyltransférases. La méthylation de l'ADN est nécessaire à l'empreinte

génétique unique de chaque individu. Dépendamment, le cycle de la méthionine est interconnecté avec le cycle de reméthylation du tétrahydrofolate.

Dans ce cycle, la CBS maintient un équilibre THF/CH₃-THF grâce au maintien de la balance homocystéine/méthionine. Le cycle du THF a pour but d'utiliser la vitamine B9 (acide folique) pour activer l'enzyme responsable de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques de la double hélice d'ADN.

Enfin, le produit de dégradation de l'homocystéine par la CBS est la cystathionine. Cette molécule est le point de départ de la voie métabolique de transsulfuration. Cette dernière est constituée de différentes étapes de transformation de l'homocystéine jusqu'à la synthèse de pyruvate au cours desquelles s'associent différents points de sortie autorisant la synthèse du sulfure d'hydrogène (H₂S)(Singh & Banerjee, 2011).

La caractéristique de l'H₂S est qu'il transite sous forme de gaz entre les cellules ; depuis quelques années il est décrit comme un nouveau neurotransmetteur indispensable à la communication interneurone (Cf paragraphe CBS et pathologies).

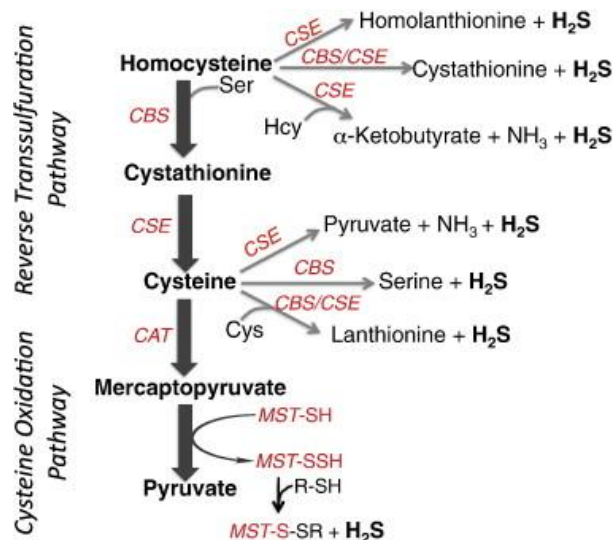


Figure 19 Schéma des réactions générant la synthèse d'H₂S catalysées par les enzymes de la voie de transsulfuration inverse et la voie catabolique de la cystéine (Singh & Banerjee, 2011).

Toujours dans les mécanismes cellulaires, la CBS agit comme médiateur du stress. La sulfhydrylation de protéines clés va créer un message de stress qui conduira à la mise en place de maturation secondaire dans le réticulum spécifique de la réponse cellulaire adéquate, notamment l'activation de NF-κB. Une des conséquences du stress est la dispersion de nombreux messages hormonaux à travers le sang. Et pour remédier à cela, la CBS, via son

activité de transsulfuration, va augmenter la synthèse d'HS2 afin d'activer la fonction vasodilatatrice des astrocytes (Paul & Snyder, 2012).

La cystathionine est donc une enzyme clé dans l'activité cellulaire et il est normal de penser qu'un changement dans le nombre de copies de ce gène pourrait conduire à des maladies affectant tout type de fonctions dans l'organisme.

b) CBS, pathologies et syndrome de Down

La CBS est depuis quelques années utilisées

comme marqueur du risque d'attaque cardiaque (Clarke, Lewington, & Landray, 2003). En effet un taux élevé d'Hcy traduit un fort stress oxydatif, accompagné d'une inhibition de la fonction endothéliale vasculaire. Ces deux composantes vont grandement favoriser la dérégulation de l'activité plaquettaire et augmenter le risque de thrombose (Lentz Life science 1997). En 2010, il a été montré que les patients touchés par des défauts cardiaques chroniques étaient plus sensibles aux infarctus si leur taux d'Hcy était supérieur à la normalité (figure 20) (Maurer et al., 2010). Cette étude aborde également l'hypothèse d'un syndrome commun entre les affections cardiaques dues à la dérégulation du taux d'homocystéine et les affections rénales sous l'appellation CRS (Cardio Renal Syndrome).

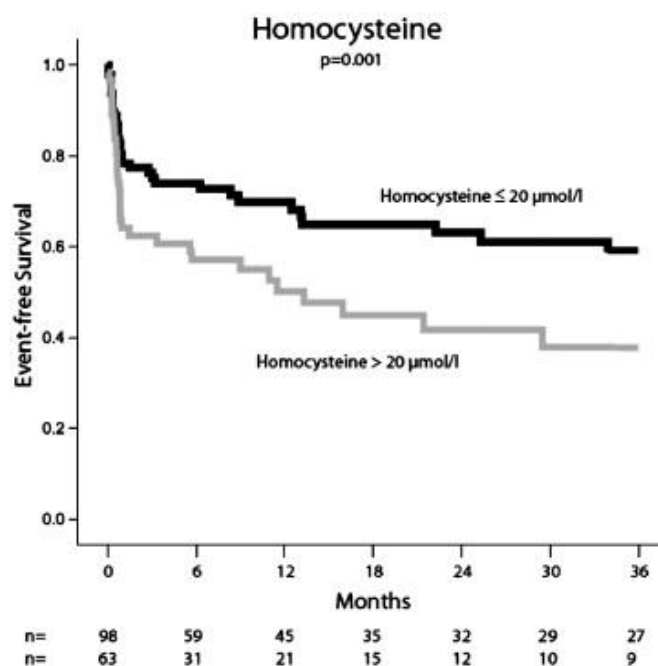


Figure 20 Courbe de survie de patients avec un taux d'Hcy $\leq 20 \mu\text{mol/l}$ (ligne noire) ou avec un taux $> 20 \mu\text{mol/l}$ (ligne grise). Il est observé une différence significative entre les deux cohortes ($p=0.001$) (Maurer et al., 2010).

Néanmoins, sur l'aspect rénal, le débat est encore en suspens quant à la position de l'homocystéine dans la pathogenèse et il semblerait que son hyperconcentration soit une conséquence du dérèglement du fonctionnement du rein et non une cause (Clarke et al., 2003). La question se poserait également dans son rôle dans les dysfonctionnements cardiaques où, si son utilité comme biomarqueur est indiscutable, son rôle comme facteur de risque ne l'est pas. Ce que l'on pourrait conclure aujourd'hui est que le taux plasmatique d'homocystéine est un très bon indicateur de l'état des fonctions cardiaques et rénales et que sa surveillance permet la mise en place de traitements précoces visant à réduire le taux plasmatique. S'il n'y a pas d'évidence de la protéine en tant que cause, les traitements diminuant sa quantité s'avèrent efficaces (Smulders & Blom, 2011).

Depuis les années 90, l'homocystéine est reconnue comme un facteur fort de risque d'athérosclérose (Refsum, Ueland, Nygard, & Vollset, 1998; Wald, Law, & Morris, 2002). Les cas d'homozygotie de *Cbs* étant rares, les études cliniques se font sur les patients hétérozygotes, représentant 1% de la population générale. Les effets ne sont pas létaux, mais la perte d'une copie de *Cbs* entraîne l'apparition précoce de maladies thrombotiques et d'athérosclérose sur des patients phénotypiquement sains (Mudd 1981). Les thromboses induites par l'hyperhomocystéinémie sont généralement provoquées par un dérèglement dans le potentiel thrombotique des cellules endothéliales et non par un dysfonctionnement pathologique des plaquettes. Ces thromboses conduisent malheureusement souvent à des blessures vasculaires fragilisant les parois et pouvant entraîner des ruptures de vaisseaux. (welsh 1998). Les données épidémiologiques ont habituellement montré une forte association entre la concentration plasmatique d'Hcy et un développement précoce de maladies cardiovasculaires. De même, des études transversales sur des cohortes contrôles ont identifié un lien entre taux plasmatique d'Hcy et développement de maladies athérosclérotiques coronariennes, carotidiennes, périphériques et aortiques (Eikelboom 1999).

Une autre fonction physiologique dépend de l'activité de CBS : la voie inflammatoire. L'homocystéine favorise la sécrétion de MCP-1, chimiokine attractrice des monocytes, et d'IL-8 qui attire les lymphocytes T par les cellules endothéliales (Poddar, Sivasubramanian,

DiBello, Robinson, & Jacobsen, 2001). L'activation de la voie inflammatoire est un deuxième facteur de destruction des vaisseaux se combinant au développement de l'athérosclérose.

Enfin, la CBS induit aussi des altérations du système nerveux central. Dès 1964, Mudd a corrélié l'homocystinurie sévère de ces patients avec le quotient intellectuel très inférieur à la population normale (QI entre 60-80). Puis il a démontré que la présence d'homocystéine dans les urines était due à une déficience en CBS (Maurer et al., 2010; Mudd et al., 1985). Comme énoncé dans le paragraphe précédent, un des effecteurs de la CBS est l'H₂S. Cette molécule est aujourd'hui incontestablement un des nouveaux neurotransmetteurs majeurs des communications interneuronales (Qu, Lee, Bian, Low, & Wong, 2008). Il y a quelques années, l'équipe du dr Wong (Wong et al., 2006) a démontré le lien entre la quantité cystéine, dérivé de l'homocystéine, et le risque d'infarctus dans un modèle expérimentale d'occlusion artérielle cérébrale chez le rat. D'autres expériences ont montré que la cystéine mimait l'activité H₂S en comparant l'effet de la cystéine/NaHS sur le risqué d'A.V.C (Qu, Chen, Halliwell, Moore, & Wong, 2006). Au final, les auteurs ont réussi à réduire le volume touché par l'A.V.C. en inhibant la synthèse d'H₂S via 4 inhibiteurs à différentes affinités pour la CBS.

Toutes ces altérations de l'activité normale des cellules sont révélées par une déficience en quantité protéine fonctionnelle ; dans le cas de la trisomie 21 le nombre de copie du gène est multiplié par 1,5, il est attendu d'observer des phénomènes pathogéniques inverses de ceux qui viennent d'être présentés.

En 1999, Taub et son équipe ont mesuré chez les enfants SD une augmentation de douze fois du taux de CBS à partir de cellules myéloblastiques (Taub et al., 1999). Des analyses post mortem sur des tissus cérébraux ont confirmé l'augmentation du taux de CBS chez les patients SD tout au long de la vie (figure 21). Cette mesure a également été confirmée sur des coupes post mortem de cortex avec une plus grande proportion de cellules astrocytaires exprimant l'enzyme.

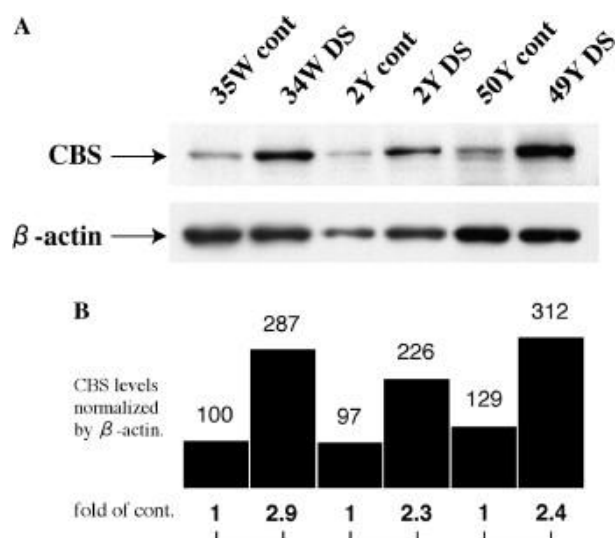


Figure 21 Mesure quantitative par Western Blot de la CBS dans le cerveau humain de 6 patients post mortem, âgés de 35 semaines (35W), 2 ans (2Y) et 50 ans (49/50Y). La CBS est augmentée d'environ 2,5 fois chez les patients SD par rapport aux contrôles (Ichinohe et al., 2005).

Une des conséquences de la surproduction de la CBS dans la trisomie 21 est la surproduction d'H₂S ; Kamoun en a émis l'hypothèse d'une corrélation entre la surexpression de la CBS et une hyperproduction d'H₂S dans le cerveau (Kamoun, 2001). Comme décrit dans le paragraphe des fonctions de la CBS, un des produits de réaction est le sulfure d'hydrogène. Une étude chez la souris a démontré que l'ajout *in vitro* d'H₂S en concentration physiologique dans l'hippocampe facilitait la transmission synaptique, et donc la LTP via le contrôle du recrutement des récepteurs glutamatergiques de type NMDA (figure 22). Cette équipe fût pionnière en présentant l'H₂S comme un nouveau neuromédiateur (Abe & Kimura, 1996; Eto & Kimura, 2002; Kimura, 2002).

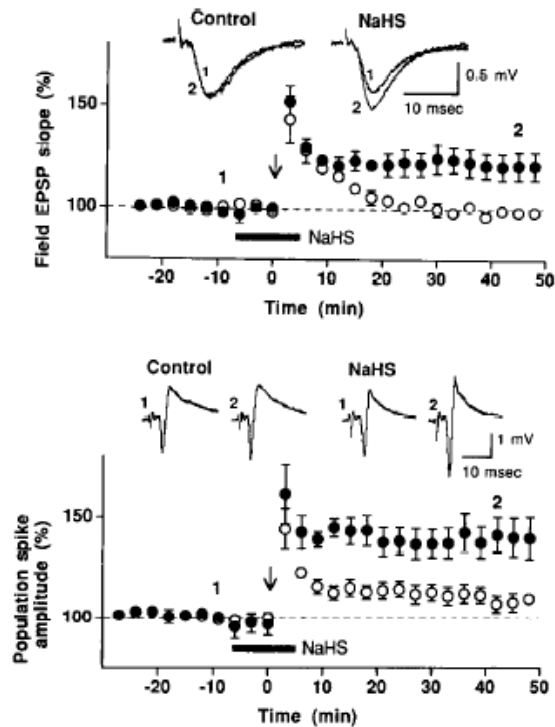


Figure 22 Des concentrations physiologiques ($130\mu\text{M}$) de H₂S facilitent l'induction de la LTP dans l'hippocampe après une faible stimulation téτανique, par l'observation des influx nerveux post synaptiques excitateurs (en haut à gauche) et l'amplitude des pics calciques (en bas à gauche) (Abe & Kimura, 1996).

Plus récemment, H₂S a été impliqué dans la régulation d'autres récepteurs synaptiques que sont les GABA-B (Han et al., 2005). Au niveau pré-synaptique, ces récepteurs régulent l'exocytose des neurotransmetteurs. H₂S modulant l'activation des GABA_BR, ce neuromodulateur est donc important dans le maintien de la balance synapses activatrices/inhibitrices. Enfin, l'altération de la mémoire chez les patients Alzheimer pourrait également dépendre à plus ou moins grande échelle de la synthèse d'H₂S. Dans le cycle de la méthionine, la protéine SAM est diminuée chez les patients AD (Morrison, Smith, & Kish, 1996), et également l'H₂S (Eto, Asada, Arima, Makifuchi, & Kimura, 2002; Eto & Kimura, 2002). A l'inverse, chez les patients T21 a été mesurée une surexpression d'H₂S, malgré les similitudes phénotypiques en ce qui concerne la mémoire (Kamoun, Belardinelli, Chabli, Lallouchi, & Chadeaux-Vekemans, 2003). La figure suivante (figure 23) replace la position centrale de l'HS₂ produit par la CBS dans la régulation de certaines activités neuronales. On peut voir que cette molécule agit au niveau de la glie dans la genèse des flux calciques qui permettent l'homéostasie du calcium intracellulaire présent dans le réticulum endoplasmique ; dans les neurones, elle est un substrat nécessaire à la production des ROS, la régulation de la

LTP (confirmant les propos précédents) mais aussi l'H₂S est aussi expulsé hors de la cellule où il peut jouer des rôles inhibiteurs de dommages cellulaires.

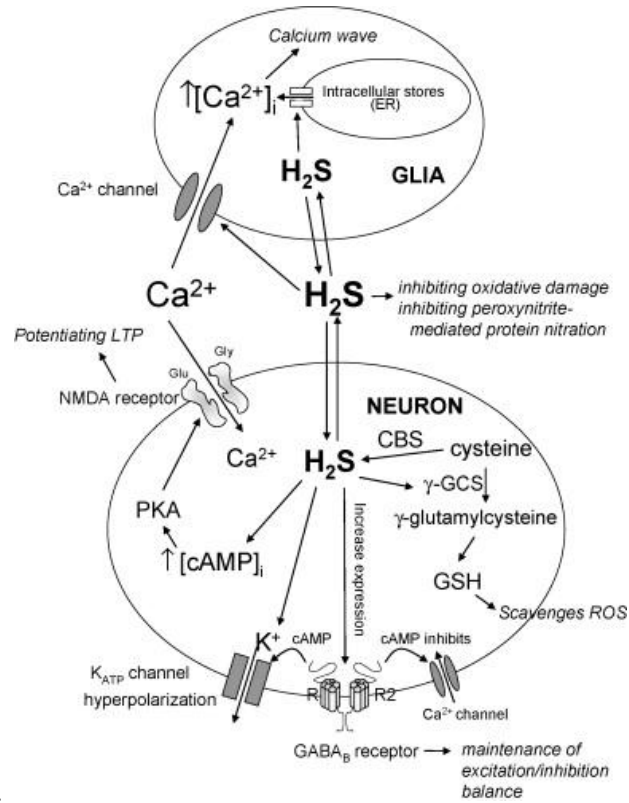


Figure 23 Fonctions physiologiques éventuelles de l'H₂S dans le système nerveux central (Qu et al., 2008).

La CBS a montré plus récemment une co-activité, par voie de cause ou conséquence, avec un des gènes majeurs de la région DSCR qui est *dyrk1a* (Hamelet et al., 2009). Delabar et ses collaborateurs ont dosé l'homocystéine chez des souris surexprimant la protéine DYRK1A d'une part, et d'autre part chez des souris invalidées pour un allèle de la CBS (Abekhouk et al. 2012). Ils ont pu montrer que lorsque *Cbs* est invalidé, la production de la protéine DYRK1A est fortement augmentée; à l'inverse, chez les souris Tg(*Dyrk1a*), donc dans un contexte de surexpression du gène, on constate un taux plasmatique très inférieur en homocystéine par rapport à des souris contrôles. Les phénotypes connus chez les souris transgéniques et hétérozygotes pour *Dyrk1a* pourraient en partie être des conséquences de la réduction de CBS. Il serait donc très intéressant de comprendre les mécanismes de régulation entre ces 2 protéines afin d'estimer l'impact de la CBS dans l'activité de cette kinase.

Grâce à toutes ces démonstrations de la position centrale de la CBS dans la physiologie humaine, dans un rôle pathogénique ou non. Afin de mieux comprendre quels

mécanismes sont mis en jeu par l'activité enzymatique de cette protéine, des modèles murins ont été développés.

c) CBS et modèles murins

(1) Sous expression :

En 1995, une équipe a créé un modèle d'inactivation (Knock-out ou K.O.) du gène de la CBS chez des souris maintenues à l'état hétérozygote sur fond mixte F1 C57BL/6Jx129/Ola. L'inactivation des 2 allèles n'affecte pas la survie des embryons, mais les nouveau-nés présentent une forte mortalité entre 2 et 4 semaines. Les survivants ont été étudiés et ils présentent un taux d'homocystéine 40 fois plus élevé que la normale, des malformations hépatiques (hépatocytes anormaux) et des cas de vascularisation ectopiques. Les souris présentent de graves troubles hépatiques, plus modérés chez l'homme, qui pourraient être une des principales causes de leurs morts prématurées (Watanabe et al., 1995).

En 2008, N. Akahoshi et ses collaborateurs ont comparé le modèle d'inactivation de la CBS de Watanabe sur plusieurs fonds génétiques. Ils ont montré que les souris C3H/HeJ survivaient jusqu'à l'âge adulte. Des études phénotypiques à 10 semaines post natales n'ont montré que peu de différences entre les individus homozygotes et hétérozygotes pour la mutation de *Cbs*. Ils ont néanmoins noté un défaut d'apprentissage et de mémoire dans le test de la boîte claire/sombre (light/dark box test). Aucun phénotype locomoteur, ni malformation cérébelleuse n'a été mis en évidence (Akahoshi et al., 2008). Nous pouvons donc affirmer que dans le cas de dysfonctionnement de la CBS, le fond génétique doit être pris en compte.

(2) Sur expression :

Le premier modèle murin a été créé par l'équipe de Wang et al. En 2004 ; cette lignée surexprime le gène de la CBS humaine sous le contrôle du promoteur des métalloprotéases. Ces souris n'ont pas été testées au niveau cognitif car, de par la spécificité du promoteur, le transgène ne s'exprimait pas dans le cerveau. Néanmoins, elles ont subi une batterie de tests biochimiques qui ont montré que toutes les voies métaboliques en amont de CBS et dépendantes de cette enzyme étaient diminuées en quantité de substrat (L. Q. Wang et al., 2004). Ils ont également réalisé avec succès un « sauvetage » des phénotypes du modèle K.O.

de *Cbs* décrit par Watanabe en croisant ce dernier avec le leur, revenant à un modèle avec 2 copies certes différentes du gène de la CBS.

Une seconde équipe (Butler, Knox, Bowersox, Forbes, & Patterson, 2006) s'est inspirée de ce modèle pour créer des clones de cellules embryonnaires, dans lesquelles elle a réalisé différentes transfections : une première lignée contenant les gènes *Cbs*, *U2af1*, *Cryaa1* humains, une seconde avec *Cbs* et *U2af1* et une dernière lignée avec seulement *Cbs*. Toutes ces constructions contiennent les séquences promotrices respectives. Dans leur étude, ils ont caractérisé leurs lignées de souris mais aucune publication concernant une étude phénotypique n'est parue à ce jour.

Très récemment, en 2012, l'article de Régnier et al. (Regnier et al., 2012) a décrit l'investigation du modèle de surexpression de la CBS seule. Ils ont montré une facilitation de la LTP hippocampique après stimulation haute fréquente mais n'ont pas décrit de performances altérées en tests cognitifs (pas de test réalisé).

(3) Sauvetage phénotypique

Un pseudo modèle transgénique K.O. a été développé en 1999 (Kraus et al., 1999); ces souris ont été dotées d'un transgène humain contenant la mutation -1278T au niveau du gène *Cbs*. Ce modèle a été généré dans le but d'étudier les effets de cette mutation chez la souris, nécessitant la présence du transgène dans un contexte sans copie de *Cbs*. C'est pourquoi un laboratoire a proposé un projet visant à sauver les phénotypes des souris *Cbs*^{-/-}. Dans l'analyse de Gupta (Gupta et al., 2009) ont été opposées deux études: d'une part ils ont généré une cohorte de souris *TgCbs_Cbs*^{-/-} grâce au modèle de Wang *et al.* (Cf chapitre précédent « surexpression ») et d'autre part ils ont obtenu des souris *Tg-1278T_Cbs*^{-/-}. Cette étude a été réalisée dans les meilleures conditions puisque les deux modèles transgéniques humains ont été créés dans le même laboratoire. Leurs résultats furent en partie surprenants car, même si certains phénotypes observés chez les *Cbs*^{-/-} persistent (alopécie, poids diminué, posture anormale, stress cellulaire endoplasmique...), d'autres phénotypes sont beaucoup plus modérés : les souris *Tg-1278T_Cbs*^{-/-} ont une durée de vie beaucoup plus longue que les *Cbs* K.O. homozygotes. Elles n'ont plus de thromboses ni problèmes vasculaires précoces. La différence pointée du doigt comme potentiellement responsable des différences de phénotypes est la concentration en homocystéine qui est beaucoup importante chez les *Tg-1278T_Cbs*^{-/-}.

Il semblerait que la souris puisse se protéger des effets néfastes de l'homocystéine jusqu'à une valeur seuil, dépassée dans le modèle transgénique humain muté.

Objet de cette étude

Dans notre étude nous avons ciblé la région de synténie du *Mmu17* avec le *Hsa21* et développé différents projets autour de cet intervalle pour comprendre les effets du dosage de la région. Un premier projet aura pour but de s'intéresser à la monosomie de la région *Abcg1-U2af1* afin de comparer les futurs résultats aux analyses du modèle Ts1Yah. Cette étude, réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Mara Dierssen à Barcelone, proposera une analyse comportementale, électrophysiologique, histologique et génomique des souris Ms2Yah.

Un second projet, toujours dans le but d'étudier l'effet de dose de la région *Abcg1-U2af1*, aura pour support la réduction de dose de cette région dans un modèle de trisomie complète du chromosome 21, le modèle Tc1. Cette étude sera uniquement comportementale, avec pour rôle un premier screening de potentiels sauvetages phénotypiques.

Le dernier projet s'articulera uniquement autour du gène *Cbs* : ce gène a été choisi comme premier candidat potentiel des phénotypes cognitifs observés chez les souris Ts1Yah. D'après les études bibliographiques, des résultats concrets ont renforcé l'impact de la protéine, en sur ou sous-production, sur le système nerveux en particulier, mais aussi de nombreux autres tissus. De plus, il a été décrit que la CBS est surexprimée à plus d'1,5 fois dans les conditions trisomiques chez l'homme et la souris. C'est pourquoi deux expériences complémentaires ont permis de montrer l'implication de la CBS dans la mémorisation visuelle. Une première expérience a permis la création d'un modèle transgénique trisomique pour la région *Abcg1-U2af1* avec 2 copies fonctionnelles de CBS en utilisant une cohorte de souris Ts1Yah croisées avec le modèle *Cbs^{tm1unc}* créé par Watanabe *et al.* (1995). L'expérience complémentaire fut d'utiliser un modèle de surexpression conditionnelle d'un transgène humain de la CBS spécifiquement dans certaines régions du cerveau (hippocampe, cortex) afin d'étudier les effets de la surexpression du gène de manière tissu spécifique.

MATERIELS ET METHODES

Projet Ms2Yah

Le matériel et méthode de ce projet est décrit dans la version de soumission de l'article intitulé « *Monosomy of the Abcg1–U2af1 genetic interval produces larger CA1 LTP and increased fear memory* » (p.129).

I. BIOLOGIE MOLECULAIRE - GENOTYPAGE

A. Extraction d'ADN génomique

La lyse enzymatique est réalisée à partir d'une biopsie de queue entre 5 mm (pour une PCR) et 1cm (pour un Southern blot), en y ajoutant du tampon d'extraction (Tris HCl 50 mM pH = 8, EDTA 10 mM pH = 8, NaCl 100 mM et SDS 1%) qui maintient l'intégrité de l'ADN et de la protéinase K à 10mg/ml, puis placée à 56°C pendant une nuit pour digérer les tissus. Le lendemain, le mélange est mixé pendant 5 min puis les protéines sont précipitées avec une solution de NaCl 6 M (V/V = 1/3) et une centrifugation de 10 min à 12000 rpm. Le surnageant contenant l'ADN est transféré dans un autre tube. L'ADN est alors précipité à l'isopropanol (V/V = 2/3) puis isolé par une centrifugation de 1 min à 12000 rpm. Les sels sont alors éliminés par deux lavages successifs à l'éthanol 70%. Le culot d'ADN est séché à température ambiante puis dissout dans du tampon TE (Tris HCl 10 mM pH=8 ; EDTA 1 mM pH=8) en l'incubant 2 heures à 65°C.

B. Réaction de Polymérisation en chaîne (PCR)

Dans le cas présent, la PCR est utilisée pour amplifier des séquences propres à chaque modèle de souris afin de distinguer les souris sauvages (wt) des souris mutantes/transgéniques : c'est ce que l'on appelle la méthode de génotypage. 3 lignées sont génotypées par PCR :

1. Lignée Tg(CamkII-cre)⁴ renommée Tg(Cre)

Cette lignée contient une construction insérée aléatoirement dans le génome de souris. Ce transgène contient un promoteur CamKII α qui permet une expression spécifique de la construction dans l'hippocampe ; le promoteur contrôle la séquence codante de la Cre. Cette lignée nous a été donnée par F. Tronche (Kellendonk et al., 1999). La PCR utilisée pour génotyper cette lignée repose sur l'amplification du gène de la *cre*. L'individu sauvage n'aura donc pas d'amplification (pas de bande sur le gel) et l'individu positif pour la Cre présentera une bande à 355pb.

2. Lignée Tg(Gfp-Hcbs)^{n°157} renommée Tg(Hcbs)

La construction de cette lignée est décrite ci-dessous. Cette dernière a été générée par la plateforme d'ingénierie génétique de l'institut clinique de la souris (I.C.S. – Illkirch). Pour la génotyper, 2 gènes sont amplifiés : le gène de la myosine qui sert de témoin positif ainsi que l'ADNc de la CBS humaine. La bande attendue pour le gène de la myosine est de 250pb. Les individus portant le transgène présenteront une seconde bande à 320pb.

a) Vérification de l'intégrité du transgène des animaux Tg(Hcbs)/Tg(Cre)

La complexité, et tout l'intérêt de ce transgène, est que sous sa forme complète la GFP est exprimée et permet une localisation visuelle des structures exprimant la construction. En croisant ces animaux par des individus porteurs de la CRE, il devrait se produire une excision du gène *Gfp* au niveau des loxP, et le nouveau transgène résultant permettra l'expression de la CBS humaine dans les mêmes structures en lieu et place de la GFP.

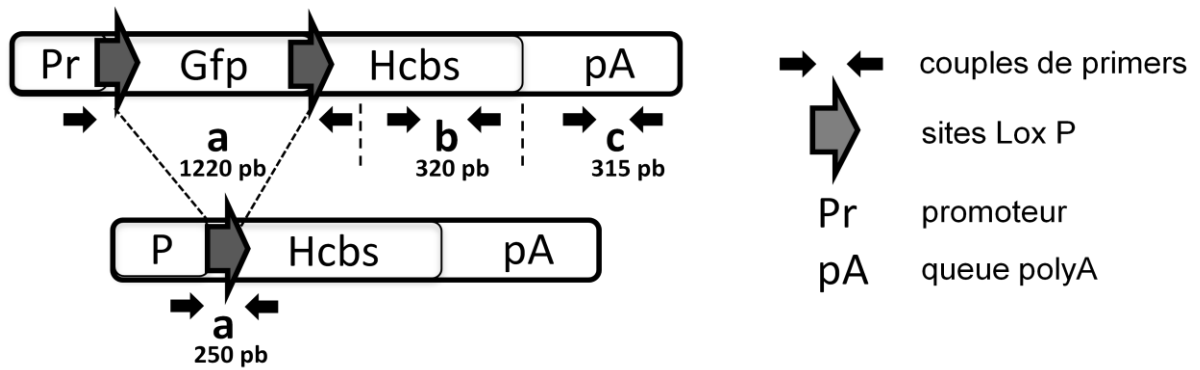


Figure 24 Transgène Tg(Gfp-hCbs) avec les couples d'amorces utilisés pour la validation : couple (a) pour la cassette Gfp, (b) le cDNA du gène Cbs humain et (c) amplifie une séquence du site de polyadénylation,

Des primers spécifiques (Tableau 1) ont été désignés afin de valider la bonne réalisation du processus de remaniement génétique dans les souris porteuses des 2 transgènes.

Remarque : le couple (b) déjà utilisé pour le génotypage n'est pas retesté. La composition du milieu de réaction et les conditions d'amplification sont les mêmes que pour la PCR décrite précédemment.

3. Lignée Cbs^{tm1unc} renommée Cbs +/-

La mutation inactivant un des allèles du gène *Cbs* a été réalisée par insertion d'une cassette néomycine entre les exons 1 et 2 de la séquence génique (Watanabe et al., 1995). La PCR de génotypage est basée sur une amplification compétitive. Les primers 1 et 2 amplifient le fragment sauvage, tandis que le primer 3 est spécifique du mutant (tableau 1). Les individus mutants présenteront donc un profil à 2 bandes, tandis que les wt n'en présenteront qu'une seule. Cette lignée provient de l'élevage du laboratoire Jackson laboratory (U.S.A.- Bar Harbor). Cette méthode est utilisée en routine pour génotyper la lignée en maintien. Dans notre expérience, nous avons croisé ces souris avec la lignée Ts1Yah. Par soucis pratique, nous pouvons établir la distribution allélique au moyen d'une seule technique de génotypage : le Southern blot (décrit au chapitre 1.4).

4. Lignée Tc1

Cette dernière lignée, décrite dans l'introduction, est également génotypée par la technique de PCR. Sont amplifiées 2 régions: la première correspond au même contrôle positif que pour la lignée Tg(Hcbs) c'est-à-dire la myosine ; la seconde est spécifique du chromosome Hsa21. Les séquences et protocole ont été adaptés de l'étude de Duchon ((Duchon, Pothion, et al., 2011). Le couple de primers est dénommé D21S55.

| Amorces | Séquences | Tm en °C |
|---|--|----------|
| Cre 1 Cre 2 | 5'-CTG CAT TAC CGG TCG ATG CA-3' 5'-ACG TTC ACC GGC ATC AAC GT-3' | 57 |
| Myo 1 Myo 2 | 5'-ATC CTG GAG ATG GAC CAC TTG G-3' 5'-GAT GAG TTT GGA CAA ACC ACA ACT AGA ATG C-3' | 58 |
| Hcbs 1 (b) Hcbs 2 (b) | 5'-CTC CCG GGA CGA ATT CGC AC-3' 5'-TCT TGT TGA TTC TGA CCA TAG GGG TGT C-3' | 58 |
| pA forward (c) pA reverse (c) | 5'- ATC CTG GAG ATG GAC CAC TTC GC-3' 5'- GAT GAG TTT GGA CAA ACC ACA ACT AGA ATG C-3' | 58 |
| Prp/h(cbs) forward (a) Prp(hcbs) reverse (a) | 5'-GCA TTC TGC CTT CCT AGT GG-3' 5'-GCT CCT TGG CTT CCT TAT CC-3' | 58 |
| Cbs +/- 1 Cbs +/- 2 Cbs +/- 3 | 5'-CGG ATG ACC TGC ATT CAT CT-3' 5'-GAA GTG GAG CTA TCA GAG CA-3 5'-GAG GTC GAC GGT ATC GAT A-3' | 62 |
| D21S55 F D21S55R | 5'-GGT TTG AGG GAACACAAAGCTTAACTCCCA-3' 5'-ACAGAGCTACAGCCTCTGACACTATGAACT-3' | 60 |

Tableau 1 Caractéristiques des couples d'amorces utilisés pour le génotypage des lignées Tg(Cre) ; Tg(Hcbs) ; Cbs +/- et Tc1.

Les sondes utilisées ont été fabriquées par la société GATC Biotech (France). Elles ont été choisies selon des critères précis (pourcentage de bases GC, taille comprise entre 20-25 nucléotides, $T_m \pm 60^\circ\text{C}$) et sont spécifiques de la séquence d'ADN à génotyper. Les PCR se sont déroulées selon les conditions décrites ci-dessous:

| Produit | Concentration finale |
|----------------------------|-----------------------------|
| H ₂ O | (Q.S.P. 13µL volume total) |
| Tampon + MgCl ₂ | 1,5 mM |
| dNTP mix | 200 µM |
| Primers | 0,33 µM chacun |
| Taq polymerase (Roche) | 1 UI |
| Volume total prémix | 13 µL |
| ADN | 150 ng (2µL) |

Tableau 2 Composition de la réaction de polymérisation en chaîne

| Paramètres du cycle | Températures | Temps | Nombre |
|----------------------------|---------------------|--------------|---------------|
| Dénaturation initiale | 94°C | 5 min | 1 x |
| Dénaturation | 94°C | 30 sec | 35 x |
| Hybridation | Tm°C | 30 sec | |
| Elongation | 68°C | 30 sec | |
| Elongation finale | 68°C | 5 min | 1 x |

Tableau 3 Conditions d'amplification

C. Fabrication d'une sonde ADN marquée à la digoxygénine (DIG)

1. La Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Dans ce cas spécifique, la PCR est requise pour synthétiser les sondes froides d'hybridation, cette technique est basée sur l'amplification d'un fragment d'ADN à l'aide d'amorces. Les amorces sens et anti-sens, utilisées pour la fabrication de la matrice, sont répertoriées dans le tableau 5. Les conditions du protocole de PCR et des conditions d'amplification sont les mêmes que précédemment sauf pour la température d'hybridation qui est indiquée dans le tableau.

| Oligonucléotides | Tm en °C |
|---|-----------------|
| <p align="center">Sonde Ampi</p> <p align="center">5'-TCT TAG ACG TCA GGT GGC AC-3'</p> <p align="center">5'- CTC ACG TTA AGG GAT TTT GGT C-3'</p> | 58 |
| <p align="center">Sonde Néo</p> <p align="center">5'-GCT ATT CGG CTA TGA CTG GG-3'</p> <p align="center">5'-GAA GGC GAT AGA AGG CGA TG-3'</p> | 62 |

Tableau 4 *Oligonucléotides utilisés pour synthétiser les amplicons/sondes d'ADN qui seront marqués à la digoxigénine.*

2. Purification de la matrice d'ADN

Un échantillon du produit de PCR est déposé sur un gel à 2% d'agarose. Si le produit de PCR est pur et sans amplification aspécifique, la matrice est directement purifiée avec le kit Qiagen "PCR Purification kit" (Réf.. 28704). Dans le cas contraire, la totalité du produit PCR est déposée sur un gel d'agarose, puis après électrophorèse, la bande d'ADN à extraire (matrice) est découpée à l'aide d'une lame de scalpel sous UV puis extraite avec le kit Qiagen QIAExII "Gel Extraction Kit (150)" (réf. : 20021).

3. Marquage de la sonde d'ADN à la digoxigénine (DIG)

Le marquage des sondes se fait à partir de 1 à 3 µg de matrice. Cet ADN matrice est dénaturé 10 min dans un bain-marie à 100°C. Les ADN dénaturés sont ensuite figés en immergeant le tube dans la glace 1 min avant usage. Le volume réactionnel peut varier de 100 à 150 µl. La matrice est marquée avec le mélange réactionnel du kit Roche Molecular (DIG DNA Labeling and detection kit) pendant 20 h d'incubation à 37°C. La réaction est stoppée à l'EDTA (0,5 M), puis chauffée 10 min à 65°C.

4. Purification de la sonde sur colonne G50 sephadex

La sonde marquée est purifiée sur colonne d'exclusion G50 sephadex, qui permet d'éliminer les oligonucléotides non incorporés.

L'extrémité d'une seringue de 1ml est bouchée avec de la laine de roche, et la seringue

est placée dans un tube de 14 ml à fond rond. La seringue est remplie avec la solution de résine G50 sephadex et centrifugée 2 min à 800 rpm. Les deux étapes précédentes sont renouvelées jusqu'au remplissage de la seringue. La colonne est rincée avec 1 ml de STET (Tris HCl 10 mM pH 8, NaCl 0.1M, EDTA 1 mM pH 8, Triton X-100 5 % (v/v)) et centrifugée 2 min à 800 rpm. Le tube est ensuite remplacé par un tube propre. Du STET est ajouté si besoin à la solution de sonde marquée pour compléter le volume à 150 µl avant de déposer le tout sur la colonne G50 sephadex. Les 150 µl de sonde marquée sont alors passés à travers la colonne par une centrifugation de 2 min à 800 rpm. 150 µl de STET sont déposés sur la colonne qui est à nouveau centrifugée 2 min à 800 rpm pour la rincer. L'éluat de solution de sonde marquée purifié est ainsi récupéré (minimum 250µL).

5. Dosage de la sonde par immunoblotting

La quantité de sonde marquée à la digoxigénine est évaluée avec un anticorps anti-DIG. L'ADN contrôle (5ng/µl), fourni dans le kit de marquage (kit Roche Molecular "DIG DNA Labeling and detection kit"), est dilué en série de la même manière que la sonde afin de réaliser une quantification comparative. Chacune des dilutions est déposée sur une membrane de nitrocellulose avant d'être fixée par cuisson 30 min à 80°C. La membrane est ensuite lavée dans du tampon I + tween (Acide Maléique 0,1 M, NaCl 0,15 M pH 7.5, tween 20 0,3 % (v/v), puis incubée 30 min avec du tampon I (Acide Maléique 0,1 M, NaCl 0,15 M pH 7.5) contenant 1 % d'une solution de blocage (Roche, Cat. No. 1096176). La membrane est mise en contact 30 min avec l'anticorps (Roche, Cat. No. 11093274910) dilué au 1/30000ème dans du tampon I + solution de blocage. Ensuite, elle est lavée de nouveau dans du tampon I et 0,3 % tween avant d'être rééquilibrée dans du tampon III (Tris HCl 100 mM pH = 9,5, NaCl 100 mM). La révélation de l'anticorps se fait avec une solution de NBT/BCIP (Roche, Cat. No. 11681451001) pendant une nuit à l'obscurité. Après avoir rincé la membrane, la concentration de la sonde marquée est déterminée visuellement par comparaison avec la concentration connue de l'ADN contrôle.

D. Méthode de Southern

La méthode de Southern est une technique de séparation de fragments d'ADN suivie d'un transfert sur membrane et d'une détection spécifique d'un fragment par l'intermédiaire d'une sonde marquée. Nous avons utilisé cette technique pour génotyper les souris de la lignée Ts1Yah et Ms2Yah, conformément au protocole de Lopes et al. (Pereira et al., 2009).

Les lignées Cbs+/- et Ts1Yah sont croisées entre elles afin d'évaluer la réduction de dose de la CBS. Ces lignées possèdent un facteur commun : la présence d'une cassette de sélection à la néomycine. Les individus issus du croisement ont alors été identifiés par la méthode de southern, facilitant le diagnostic du génotype par une seule et même technique.

1. Digestion enzymatique d'ADN génomique et transfert sur membrane

10 µg d'ADN génomique sont digérés en présence de 10 U d'enzyme EcoRI dans le tampon relatif à celle-ci et à la concentration de 1X. Le mélange de digestion est incubé une nuit à la température relative à l'enzyme (généralement 37°C). Après digestion, l'ADN est séparé par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,4 ou à 0,7%, selon les tailles de bandes attendues. Cette digestion d'ADN est ensuite visualisée et photographiée sur une plaque UV équipée d'une caméra de type ST50 Biocapt (Fischer Bioblock Scientific).

Avant de transférer les fragments d'ADN sur membrane de nitrocellulose (Hybond N, Amersham), l'ADN contenu dans le gel est dénaturé 20 min dans un bain de NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M sous faible agitation. Ce tampon est ensuite retiré et le gel d'agarose rincé à l'eau milliQ. Le gel est neutralisé dans deux bains successifs de Tris 0,5 M pH = 7,4, NaCl 1,5 M, EDTA 0,5 mM qui sont effectués respectivement pendant 30 et 15 minutes. Les fragments d'ADN sont alors transférés par capillarité sur la nuit, avec une solution de SSC 10X pH = 7 (NaCl 3 M, tris sodium cytrate dihydraté 0,3 M) sur la membrane. Le lendemain, l'ADN est fixé 2 heures à 80°C.

2. Hybridation de la sonde marquée à la DIG et détection au CDP-Star

La membrane de nitrocellulose est réhydratée dans du NaPi 500 mM pH = 7,2, avant d'être enroulée dans un tube à hybridation. 30 ml de tampon Church (NaPi 0,5 M, SDS 7 %, EDTA 1 mM) à 65°C sont ajoutés à la membrane, qui est ensuite incubée 30 min dans un four à hybridation maintenu à 68°C.

La sonde DIG (1 à 3 µg) est dénaturée dans 150 µl de tampon Church, pendant 10 min au bain-marie à 100°C, puis transférée dans 20 ml de tampon church. Après les 30 min, les 30 ml de tampon Church contenus dans le tube à hybridation sont remplacés par la sonde, qui restera au contact de la membrane une nuit à 68°C.

Pour la révélation de la sonde avec l'anticorps anti-DIG, la membrane est lavée deux fois 5 min dans du tampon de lavage Church à 65°C, (NaPi 40 mM, SDS 1 %, EDTA à 0,5 mM), puis dans un tampon I + tween (Acide Maléique 0,1 M, NaCl 0,15 M pH 7.5, Tween20 à 0,3 % (v/v)). La membrane est ensuite placée avec du tampon I (Acide Maléique 0,1 M, NaCl 0,15 M pH 7.5) et 1% d'une solution de blocage pendant 30 min avant d'être mise en contact 30 min avec l'anticorps dilué au 1/30000ème (Roche, Cat. No. 11093274910) dans du tampon I + solution de blocage 1%. La membrane est lavée de nouveau dans du tampon I et 0,3 % tween, puis rééquilibrée dans du tampon III avant la détection de l'anticorps avec une solution de CDP-Star (Roche, Cat. No. 11685627001). La réaction de chimioluminescence est détectée sur un film d'autoradiographie (Kodak Réf. V1651512) après 2 à 4 heures d'exposition.

3. Déshybridation et réhybridation de la membrane de nitrocellulose

Les membranes peuvent être réutilisées pour une autre hybridation. Dans ce cas, la première sonde hybridée à l'ADN est décrochée par une incubation de 5 min dans un bain de NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M puis neutralisé 5 min dans du NaPi 50 mM. Ensuite, il suffira d'hybrider avec une nouvelle sonde comme décrit précédemment.

E. Hybridations transcriptomiques sur puces Affymetrix

Les changements comportementaux des individus Ts1Yah ont orienté notre recherche sur l'étude de l'hippocampe, plaque tournante de la mémorisation et de l'apprentissage chez les mammifères. Pour cela, 10 hippocampes (5 wt et 5 Ts1Yah) ont donc été prélevés et congelés instantanément en azote liquide. Ces organes vont servir à étudier les variations d'expressions géniques engendrées par la duplication.

1. Extraction des ARN totaux

50-100 mg, soit la totalité de l'organe pour un hippocampe, sont prélevés et y est ajouté 1 mL de TRIzol (Invitrogen). Les tissus sont broyés dans des tubes d'homogénéisation CK28 (Precellys - France) sous agitation durant 20 s à 5000 rpm. Le broyage se fait via la présence de billes de céramique de 2,8 mm de diamètre dans les tubes. Le broyat est incubé 5 min à température ambiante puis est ajouté 0,2 mL de chloroforme par tube. Après agitation très active, les tubes sont à nouveau incubés 5 min à température ambiante. S'en suit une centrifugation (15 min à 12000 rpm à 4°C). La phase aqueuse est transférée dans un tube stérile auquel est additionné 500µL d'isopropanol pour précipiter les acides nucléiques. La fin de l'extraction suit le même protocole que pour l'ADN. Après agitation intense, les tubes sont centrifugés 10 min à 12000 rpm ; s'en suivront 2 lavages du culot en éthanol 70° (5 min à 7500 rpm). Toutes les étapes concernant une extraction d'ARN se font à 4°C. Le culot séché est repris dans 50 µL d'eau RNase free et dissout 10 min à 58°C.

Pour séparer le TRIzol des acides ribonucléiques, les échantillons sont lavés selon un protocole « clean up » recommandé par le kit d'extraction « RNeasy mini kit plus » (Qiagen). La qualité des ARN totaux est vérifiée sur puces en microgel via un LabChip90 (Caliper). Cet appareil va analyser l'intégrité des 2 principaux ARN présents dans l'extrait, à savoir les ARN ribosomiaux 18S et 28S. Les ARN totaux retenus ont une valeur RIN (RNA Integrity Number) supérieure à 7,0.

2. Hybridation sur puces

Pour cette expérience, nous avons opté pour la technologie Affymetrix. Les ARN totaux extraits ont été pris en charge par la plateforme Biopuces de l'I.G.B.M.C. (www-microarrays.u-strasbg.fr). Les puces utilisées sont des modèles Mouse Gene 1.0 ST. Elles comportent 770 317 sondes couvrant 28 853 gènes. Chaque hybridation est unique et donnera une valeur de fluorescence propre pour chaque sonde. Après hybridation, les puces sont scannées et les images numériques sont converties en données brutes de fluorescence chiffrées. Les fichiers que nous avons récupérés sont sous format CEL et ne sont lisibles que par certains logiciels. Pour notre part, nous avons normalisé nos données brutes grâce au logiciel Partek© afin d'obtenir des valeurs RMA (Robust Multiarray Average). Ces valeurs sont déterminées par l'algorithme développé par Irizarry (Irizarry et al., 2003). L'analyse des données a été poursuivie de manière manuelle selon différents critères de restriction. Il a été considéré que 30% des sondes exprimées étaient indissociables du bruit de fond (RMA > 4,15). Il a donc été retenu 25 930 sondes exprimées de manière significatives. Chaque valeur RMA de chaque sonde a été transformée en valeur normalisée par rapport à un individu désigné comme référence, correspondant à l'individu wt ayant les RMA les plus proches de la moyenne du groupe. Pour chaque RMA nous avons donc calculé une RMA normalisée :

$$\text{RMA normalisée} = 2^{(\text{RMA référence} - \text{RMA échantillon})}$$

Les RMA normalisées sont moyennées par groupe. Le facteur de comparaison a finalement été calculé et est dénommé Fold Change (FC). Cette valeur est finie comme le rapport des moyennes normalisées entre les individus wt et Ts1Yah. Par définition, les valeurs inférieures à 1 définissent les sondes sous exprimées chez le mutant, et les valeurs supérieures à 1 celles surexprimées. Un filtre supplémentaire a été appliqué aux valeurs retenues précédemment (RMA < 4,15) ; ont été conservés les FC supérieurs à 1,20 ou inférieurs à 0,8. Enfin, le dernier filtre correspond à la significativité statistique. Pour comparer les 2 groupes a été utilisé un test de student et ont été sélectionnées les valeurs de $p < 0,05$.

Au final, 447 gènes ont été extraits de cette analyse, englobant les gènes sur et sous exprimés, et en conservant les séquences référencées comme non codantes à l'heure actuelle.

F. PCR quantitative en temps réel (quantitative Real-Time PCR)

Nous avons eu recours à cette technique afin de quantifier l'expression du transgène Tg(Hcbs), dans le modèle de surexpression associé aux souris Tg(Hcbs), seul dans un premier temps, puis les Tg(Hcbs)/Tg(Cre). Nous avons choisi la technologie Taqman, apportant une mesure plus précise sur des faibles variations de quantité d'ARN relative (en comparaison à la technologie SYBRgreen). Le design des sondes comporte un fluorophore de type FAM en 5' et un quencher de type BHQ-1 en terminaison 3'. Toute quantification d'ARN cibles doit être comparée à l'expression de gènes dit « de ménage », gènes qui s'expriment de manière homogène dans tous les types cellulaires. Nous avons sélectionné 4 gènes de ménage (*Hprt1*, *Pgk1*, *PpiA*, *Gnas*) et 2 gènes cibles que sont le gène murin de la *Cbs* et le transgène humain *hcbs* :

| couple de primers et sondes | Séquences (sens 5'-3') | Tm en °C |
|------------------------------------|---------------------------------------|-----------------|
| Primer forward HPRT1 | GCA AAC TTT GCT TTC CCT GG | 70 |
| Primer reverse HPRT1 | ACT TCG AGA GGT CCT TTT CAC C | |
| Sonde HPRT1 | CAG CCC CAA AAT GGT TAA GGT TGC AAG | |
| Primer forward PGK1 | ATT CTG CTT GGA CAA TGG AGC | |
| Primer reverse PGK1 | AGG CAT GGG AAC ACC ATC A | |
| Sonde PGK1 | AAC TCC GTT GTC CTT ATG AGC CAC CTG G | |
| Primer forward PpiA | AGG GTT CCT CCT TTC ACA GAA TT | |
| Primer reverse PpiA | TGC CAT TAT GGC GTG TAA AGT C | |
| Sonde PpiA | TCC AGG ATT CAT GTG CCA GGG TGG | |
| Primer forward Gnas | AGA ACA TCC GCC GTG TCT TC | |
| Primer reverse Gnas | CCT TCT TAG AGC AGC TCG TAT TGG | |
| Sonde Gnas | CGT GAC ATC ATC CAG CGC ATG CAT | |
| Primer forward MmCbs | GCA CCT GTG GTC AAC GAG TCT | |
| Primer reverse MmCbs | CAG CAG GGA TGA CAG CAT GT | |
| Sonde MmCbs | CCC GAG GGT CAC CAT CCC TAG GAT G | |
| Primer forward HsCbs | CAG TTC AAA CAG ATC CGC CTC | |
| Primer reverse HsCbs | TCC ATC TCC AGG ATG TGC G | |
| Sonde HsCbs | CGG ACA CGC TGG GCA GGC TC | |

Tableau 5 Caractéristiques des couples d'amorces/sondes utilisés.

Les ARN wt, Tg(Hcbs) et Tg(Hcb)/Tg(Cre) ont été extraits selon le protocole précédent (1.5.1). Pour améliorer l'enrichissement en ARN dans le produit, la contamination ADN est éliminée par les colonnes adéquates selon le protocole du kit « RNeasy mini kit plus » (Qiagen). Les ARN purifiés sont ensuite convertis en ADN complémentaires double brins grâce au kit SuperScript™ III First strans synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen SA) selon les recommandations du protocole fourni. Les ADNc récoltés seront les substrats des réactions de PCR quantitative en temps réel. Les conditions de PCR sont indiquées dans le tableau suivant (tableau 6) ; les réactions se font grâce au mix spécifique pour PCR quantitative Taqman Fast BLUE qPCR MasterMix plus (EUROENTEC Belgium, ref. RT-QP2X-03+FB). Les paramètres d'amplification sont répertoriés dans le tableau 7.

| Produits | Concentration finale |
|---------------------|-----------------------------|
| H2O | (Q.S.P.11µL) |
| Q PCR master mix | 1X |
| Sonde | 100nM |
| Primer up | 300nM |
| Primer down | 300nM |
| Volume total prémix | 11µL |
| ADNc | 60ng (4µL) |

Tableau 6 Composition de la réaction de qRT-PCR

| Paramètres du cycle | Températures | Temps | Nombre |
|--|---------------------|--------------|---------------|
| UNG (Uracil N-Glycosylase) | 50°C | 2 min | 1x |
| <i>MeteorTaq</i> activation / UNG inactivation | 95°C | 5 min | 1x |
| Denaturation | 95°C | 15 sec | 40x |
| Hybridation / Elongation | 60°C | 1 min | |

Tableau 7 Conditions standards

Nous avons testé 15 individus pour cette expérience, 5 de chacun des trois génotypes.. Dans un premier temps, les valeurs de Ct (Cycle threshold) ont été récoltées à partir des données enregistrées. Chaque Ct correspond à la valeur à partir de laquelle le seuil de détection de la fluorescence est atteint. Ces Ct sont proportionnels au nombre de copies de l'ADNc amplifié présentes au départ dans l'échantillon. Nous considérons que le Ct est atteint pendant la phase exponentielle de la PCR et que l'efficacité de nos sondes est supérieure à 95% (vérifiée au moment de la validation des sondes). Nous considérons la valeur de Ct de la

cbs humaine pour les wt non nulle (en sachant qu'il n'y a pas d'expression du transgène chez ces individus) mais équivalente au seuil de détection. Pour les calculs de quantification relative, nous avons suivi les recommandations du manuel de l'utilisateur du logiciel GeNorme version 3.4 (Vandesompele et al., 2002). Ce logiciel nous a permis également de définir le facteur de normalisation. Les différences statistiques ont été déterminées par un test de student.

II. TESTS DE COMPORTEMENT

Nous avons réalisé une batterie de tests comportementaux pour évaluer les aspects cognitifs et moteurs de nos souris. Pour l'ensemble de ces tests, les animaux sont gardés dans des conditions EOPS, avec nourriture et boisson *ad libitum*. Seuls les mâles sont utilisés, l'œstrus pouvant induire un comportement différent selon la période du cycle des femelles. L'isolement des animaux est contre-indiqué, il peut induire des comportements anxieux et/ou hyperactifs ; nos cohortes étaient donc composées de cages de 2-5 animaux. 30 minutes avant le début de chaque test, les souris sont placées dans la salle d'expérimentation. 6 cohortes ont été étudiées :

- Une cohorte Tc1 x Ms2Yah : 12 animaux wt, 11 Ms2Yah, 11 Tc1 et 8 Tc1Ms2Yah.
- Trois cohortes Ts1Yah x Cbs+/- :
 - ✓ 9 wt, 8 Cbs +/-, 8 Ts1Yah et 10 Ts1Yah/Cbs +/- (fond C57BL/6J)
 - ✓ 14 wt, 13 Cbs +/-, 13 Ts1Yah et 14 Ts1Yah/Cbs +/- (1^{ère} cohorte C57BL/6NTac);
 - ✓ 16 wt, 14 Cbs +/-, 9 Ts1Yah et 10 Ts1Yah/Cbs +/- (2^{ème} cohorte C57BL/6NTac).

Une explication doit être donnée à l'élaboration de ce grand nombre de cohortes. La première cohorte sur fond B6J a été formée pour évaluer selon les différents tests comportementaux définis les potentielles restaurations phénotypiques engendrées par la diminution d'une copie de la CBS dans un contexte de trisomie partielle.

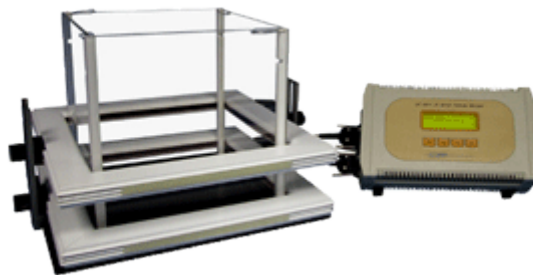
- Une cohorte Tg(Hcbs) x Tg(Cre) : 13 wt, 11 Tg(Cre), 12 Tg(Hcbs) et 14 Tg(Cre)/Tg(Hcbs).

Cette cohorte a été établie afin de confirmer la cible CBS comme origine des défauts de mémorisation à court terme. Les souris doubles transgéniques produisent donc une quantité

supérieure aux normes physiologiques de la protéine CBS, ce qui permet d'étudier l'impact de la surexpression de la protéine dans un contexte sauvage. Remarque : les souris Tg(Hcbs) ne performant pas significativement dans le test de reconnaissance d'objets, un second groupe Tg(hcbs) versus wt a été établi pour confirmer la bonne mémorisation de ces animaux.

Les animaux furent transférés à l'âge de 10 semaines de l'animalerie d'élevage à la zone de comportement. La semaine suivante les animaux sont laissés libres pour l'acclimatation au nouvel environnement. A leur 12^{ème} semaine, les animaux sont manipulés quotidiennement, chacun pendant plusieurs minutes, pour les habituer à la préhension et à l'odeur de l'expérimentateur. Il ne doit y avoir en aucun cas changement d'expérimentateur entre les tests. Le début des tests commence donc durant leur 13^{ème} semaine et ils se déroulent dans cet ordre :

1. Le champ ouvert



Ce test analyse le comportement exploratoire du rongeur dans un espace clos. On l'utilise avant tout pour mesurer le niveau d'activité basale, la locomotion et l'activité exploratrice d'une lignée. Il permet également d'évaluer des comportements axiogènes, qui se traduisent par des parcours exclusivement périphériques, la zone centrale exposant davantage l'animal aux dangers environnementaux. Nous avons utilisé deux types d'enceintes, toutes les deux validées par des expériences précédentes qui n'ont pas montré de différences phénotypiques. Le premier système se compose d'une enceinte carrée de 40cm de côté autour de laquelle sont placés des capteurs de mouvement qui détectent la position de l'animal en temps réel.

Le second système se compose d'une enceinte ronde de 55cm de diamètre placée sous une caméra permettant un video tracking de l'animal. Selon les 2 conditions, le test se compose d'une seule et unique session de 30min. Entre chaque individu, l'arène est nettoyée consciencieusement avec de l'eau et de l'alcool afin de masquer les odeurs du prédécesseur.

L'analyse permet de calculer différents paramètres, dont la distance parcourue, la vitesse, le temps passé dans les zones périphérique, intermédiaire et centrale. Il permet aussi de voir l'habituation de l'animal au cours du temps en fractionnant les données par tranche de 10 minutes.

2. La reconnaissance d'objets

Ce test est utilisé pour évaluer la mémoire de travail des animaux et évaluer leur curiosité instinctive pour la nouveauté. La mémoire mise en jeu permet d'évaluer le souvenir immédiat (quelques minutes à quelques heures). Le test se déroule dans la même arène que le champ ouvert, 24 heures après celui-ci. Il se déroule en 2 étapes : une première de 10min avec deux objets similaires durant laquelle la souris va mémoriser la position et la forme des objets en présence. La seconde séance de test a lieu 1 heure après la première, elle dure également 10 minutes et cette fois un des deux objets est remplacé par le nouvel objet. Nous avons utilisé comme objet une bille opaque de couleur verte et un dé placé avec les mêmes faces toujours dans la même orientation. Le nouvel objet ainsi que son emplacement dans l'arène sont randomisés. On mesure le temps d'exploration du nouvel objet et de l'objet familier au cours de la session test pour quantifier le pourcentage d'explorations des deux objets ainsi que l'indice de discrimination. Cet indice se calcule par la formule suivante :

$$I = (NO / NO+OF) \times 100$$

NO = temps passé sur le nouvel objet.

OF = temps passé sur l'objet familier.

Un indice significativement supérieur à 50 détermine une préférence pour le nouvel objet.

Le changement de fond génétique pour la deuxième cohorte n'a pas été choisi dans le contexte expérimental mais suite à un déménagement du laboratoire et une disponibilité facilitée de ce nouveau fond, proche des C57BL/6J. Les animaux Ts1Yah de cette cohorte n'exploraient pas du tout les objets, nous avons entrepris la réalisation d'une 3^{ème} cohorte pour confirmer les phénotypes exprimés dans la 1^{ère} cohorte. Ce 3 test n'a malheureusement pas été retenu ; l'invalidation du test a été causée par l'absence de reconnaissance des individus contrôles de l'expérience.

3. La piscine de Morris



L'orientation et la mémoire spatiale contribuent à la survie des toutes les espèces, dont notre modèle rongeur. Il existe plusieurs tests qui permettent d'évaluer la capacité des souris à cartographier leur environnement ; l'un des plus courants est celui de la piscine, développé par Richard Morris dans les années 80. Il en existe plusieurs versions qui permettent d'étudier différentes formes d'apprentissage et de mémoire. Ces tests se font dans un contexte de luminosité faible (25 lux au centre de la piscine) et homogène, à une température constante (22° extérieur, entre 20° dans l'eau. La température de l'eau est très importante, elle ne doit ni être trop chaude pour que la souris n'ait pas de sensation de confort, ni trop froide pour que le milieu ne soit pas excessivement aversif.

a) Version plateforme cachée :

Cette version est issue des études de Morris et Morice (Morice et al., 2008; R. Morris, 1984). Le système se compose d'une piscine ronde de 1,5m de diamètre, remplie d'un liquide rendu opaque par l'adjonction de 2 litres d'OPULYN301 (©Romh&Haas). Dans la version cachée, la souris doit apprendre à retrouver une plateforme (PTF) submergée en se repérant dans l'espace grâce à des indices visuels disposés dans la pièce. La taille de la plateforme est de 8,5 cm, immergée 1 cm sous le niveau de l'eau. L'ensemble est placé sous une caméra qui permettra un video tracking. La piscine est divisée virtuellement en quatre quartiers identiques par les 4 points cardinaux. Pour nos expériences, les 4 quarts sont appelés NE, NO, SE, SO. La plateforme est localisée toujours dans le même quart tout au long de l'expérience (NE). L'expérience commence par une phase d'habituation durant laquelle on laisse nager librement la souris pendant 90s. Si l'animal n'a pas trouvé la plateforme, on la guide avec le doigt jusqu'à son emplacement, puis on la laisse quelques secondes pour qu'elle associe la plateforme comme le lieu d'extraction de la piscine. L'exercice d'apprentissage fut différent entre la cohorte Tc1xMs2Yah et celle Ts1Yah x Cbs+/- :

- Pour la cohorte Tc1xMs2Yah ; nous avons réalisé deux essais de 90s par jour pendant 6 jours consécutifs (Temps entre deux essais d'environ 90min). Les souris qui ne trouvent pas la plateforme sont gentiment guidées vers elle. Toutes les souris sont laissées 15s sur la plateforme. Ce protocole est adapté de Duchon et al. (Duchon, Pothion, et al., 2011; Morice et al., 2008). Ce protocole est le seul qui diffère parmi toutes les cohortes. L'étude référence pour ce lot n'est pas la publication de Lopes mais la publication de Morice puis Duchon.

- Pour la cohorte Ts1YahxCbs+/- ; nous avons réalisé quatre essais de 90s par jour pendant 5 jours consécutifs (Temps entre deux essais d'environ 90min). Toutes les souris sont laissées 15s sur la plateforme. Ce protocole est adapté ici de Lopes et al, qui a décrit le phénotype d'apprentissage plus rapide chez les Ts1Yah (Pereira et al., 2009).

Comme le système ne comporte pas d'indices visuels proximaux autour de la piscine, les souris doivent utiliser les indices distaux (sur les murs de la pièce) pour s'orienter et nager vers la plateforme. Pour augmenter l'utilisation de stratégie spatiale, les souris sont déposées dans l'enceinte de manière randomisée à chaque essai. Pour s'assurer que tous les animaux ont employé une stratégie de recherche spatiale, on réalise un probe test (PT) 24 heures après la fin des séances d'apprentissage. La plateforme est alors retirée de la piscine. Les souris qui ont retenue la position de la plateforme grâce à une stratégie spatiale vont avoir tendance à focaliser leur nage dans le quadrant NE où elle se situait durant la phase d'apprentissage. Le 2^e point de contrôle de l'utilisation des indices spatiaux est la nouvelle position de départ des animaux (unique pour le PT), à l'opposé de la position initiale de la plateforme, soit le SO. Pour éviter des biais de les distances parcourues, la position de départ est la même pour toutes les souris. Les données analysées sont la distance parcourue pour la phase d'apprentissage, index représentant le mieux la performance cognitive (D'Hooge & De Deyn, 2001). De la même façon, pour le probe test, nous avons analysé la distance parcourue dans la cadrant d'intérêt.

b) Version reversal :

Un jour de repos après le probe test, les souris sont à nouveau entraînées dans une nouvelle phase d'apprentissage, dans laquelle une nouvelle position de la plateforme est choisie (cadrant opposé SO). Cette nouvelle procédure permet de voir si les souris sont capables d'oublier leur apprentissage initial de la localisation de la PTF et d'en apprendre un nouveau. Après 5 jours de réapprentissage, un nouveau probe test est imposé à la cohorte pour revalider le nouvel apprentissage. Toute cette version suit le même protocole que la première version.

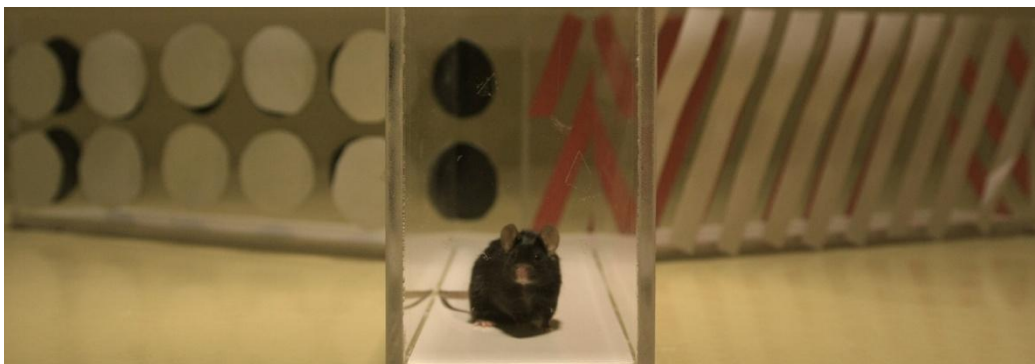
c) Version mémoire à long terme :

19 jours après le dernier probe test, on réalise un nouveau probe test pour voir le niveau de rétention de l'information. Cette version constitue la dernière épreuve concernant l'utilisation de la mémoire de référence chez la souris.

d) Version mémoire de travail :

Cette nouvelle version permet d'évaluer l'apprentissage à très court terme. Elle permet de stocker mais surtout de manipuler l'information. Dans cette version, la position de la PF change pseudo aléatoirement tous les jours. Le schéma utilisé est le suivant : SE, NE, NO, SO, SE, SO, NO, NE, SO, NE, SE. Le test est constitué de 4 essais journaliers consécutifs de 60s (un départ à chaque point cardinal) pendant 11 jours. Les souris sont laissées 20 secondes sur la plateforme, qu'elle l'ait trouvée ou non. A la fin de ces 4 essais, on réalise un 5^{ème} essai (PT) de 30s au cours duquel la plateforme est retirée les jours 1, 4 et 10. Comme dans les versions précédentes, les distances parcourues sont analysées pour les essais 1, 2, 3, 4 et les probes tests.

4. Le labyrinthe en Y



Ce test, rapide, permet de tester les fonctions cognitives à très court terme. Le système se compose d'un labyrinthe en Y où chacun des bras présente un motif particulier (cf. image ci-dessus). Le test est basé sur la préférence innée des animaux à explorer un bras qu'ils n'ont pas visité précédemment (alternance spontanée). Les souris avec un déficit de mémoire de travail ne se rappellent pas quel bras elles viennent de visiter, ce qui fait baisser le taux (Wall

& Messier, 2002). L'avantage de ce test c'est qu'il est administré sans traitement aversif pour la souris. Pour la réalisation de ce test, les souris sont placées au centre du labyrinthe, à l'intersection des 3 bras pendant et on les laisse visiter le labyrinthe pendant 8 minutes. La séquence de visite des bras est notée simultanément. L'entrée dans un bras est définie quand l'animal a placé ses 4 pattes dans le bras. Le taux d'alternance spontanée (TAS) est calculé de la manière suivante :

$$\text{TAS} = [n / (N-2)] \times 100$$

N = nombre total de bras visités

n = nombre total d'alternances (visite des 3 bras successifs différents).

La distance parcourue ainsi que le nombre total d'entrées dans les bras sont aussi comparés entre les groupes pour évaluer l'index d'activité ambulatoire.

5. Le test de la barre tournante (Rotarod)



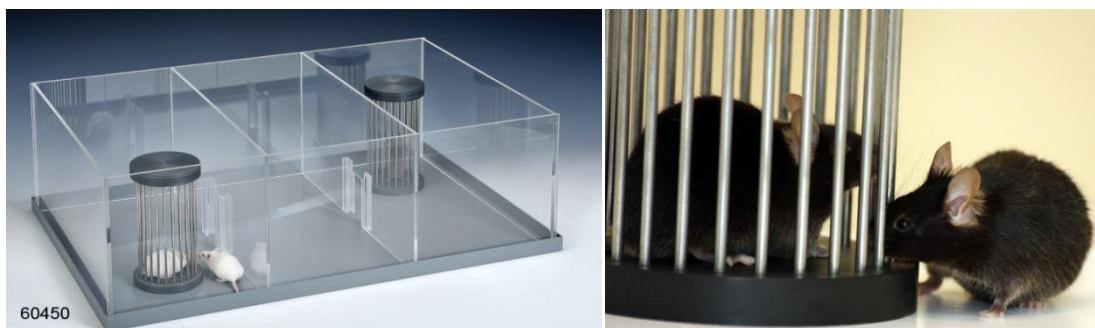
(BioSeb)

Le Rotarod est une méthode de test pour la coordination motrice des rongeurs. L'évaluation se fait via la mesure du temps de maintien de l'animal sur une barre en rotation. Nous avons utilisé le système commercialisé par Bioseb (cf. image ci dessus). Nous avons utilisé un protocole adapté d'une étude précédente (Galante et al., 2009). Dans un premier temps les animaux sont placés sur la barre, face opposée à la rotation, à vitesse minimum (4rpm) pendant 30s quelque soit le nombre de chute, en vue de les habituer au système. Ensuite les souris sont entraînées pendant 3 jours, avec 4 essais par jour (durée entre deux essais d'environ 1 heure). Au cours de ces essais, les souris sont placées sur la barre en rotation à 4 rpm avec une accélération jusqu'à 40 rpm en 5min. L'essai s'arrête quand

l'animal tombe de la barre ou lorsqu'il fait une rotation passive. On relève alors la vitesse et la latence de la chute. Le 4^{ème} jour, les souris passent deux sessions de test. Au cours de ces sessions, les souris sont placées sur la barre avec une vitesse de rotation constante pendant 2min. On réalise une série de vitesse croissante par essai, 4, 10, 16, 22, 28, 34 et 40 rpm. On note les latences de chute.

6. Le test reconnaissance sociale

Le système utilisé est celui commercialisé par Stoelting suivant un protocole précédemment décrit (Moy et al. 2004; Moy et al. 2008). Il est composé de 3 chambres successives de 20cm de large. (60 x 40 x 22(h) cm). Une ouverture (5 x 8cm) permet le passage d'une chambre à l'autre. La première phase est une phase d'habituation. Une cage vide est placée dans chacune des chambres de tests. La souris est placée dans la chambre du milieu, on la laisse explorer l'enceinte pendant 10min sous vidéo tracking. La deuxième phase de l'expérience est la phase de reconnaissance sociale. On réalise ce test social directement après cette phase d'habituation. La souris est alors emprisonnée dans la chambre centrale et une souris étrangère est placée dans sa boîte de contention (dans l'une ou l'autre des chambres de tests, aléatoirement suivant les sujets). On libère alors la souris test et on la laisse explorer pendant 10min. On enregistre alors le temps passé et le nombre d'entrées dans les deux chambres de test, ainsi que le temps passé à renifler chaque cage. La troisième phase est la phase de préférence sociale à la nouveauté. Une nouvelle souris étrangère est placée dans la cage vide. Pour cela la souris est à nouveau enfermée dans la chambre centrale. On réalise les mêmes mesures que précédemment pendant 6 minutes.



Tout le système, les cages de contention comprises, sont nettoyées à grande eau puis séchées avec du papier absorbant et ceci entre chaque animal testé. Pour éviter un biais qui serait dû à une préférence de place entre l'une des deux chambres de test, on regarde le temps passé dans l'une et l'autre des chambres durant la phase d'habituation. Les souris étrangères sont des mâles B6 adultes. Ils sont maintenus dans des cages différentes et distantes des souris testées, pour éviter les contacts visuels, olfactif et auditif. Les souris étrangères n'ont eu aucun contact physique avec les souris testées auparavant. Elles sont laissées en stabulation dans une pièce différente que les sujets testés le jour du test. Plusieurs jours avant le test, les souris étrangères sont habituées au test et à la cage de contention du système de 5 à 10min par jour pendant 5 jours. Chaque souris étrangère est utilisée seulement une fois par jour, les souris étrangères de la session sociabilité et préférence pour la nouveauté sont prises dans des cages différentes. La contention des souris étrangères dans des cages permet d'éviter les comportements agressifs et interactions sexuelles, ainsi que de s'assurer que l'approche sociale est bien due au sujet testé uniquement. Des expériences précédentes ont montrée que la lignée de souris étrangères n'interagissait pas sur l'approche sociale du sujet. L'expérience est conduite dans une salle faiblement éclairée (20 Lux).

RESULTATS

I. Etude du modèle Ms2Yah, monosomie de la région Abcg1-U2af1 (article en annexe p.129)

Ce premier modèle a été décrit dans l'étude précédente de Lopes en 2009 (Pereira et al., 2009). Un premier screening n'a pas démontré de phénotypes pertinents au niveau locomoteur ou cognitif. Néanmoins, au vue des effets de dose de la région dans le modèle trisomique Ts1Yah, nous avons voulu approfondir l'analyse du modèle monosomique sur d'autres aspects comportementaux, électrophysiologiques et moléculaires. Nous avons établi plusieurs cohortes d'animaux pour chaque projet, avec le nombre d'animaux adéquats et nécessaires ; la figure ci-dessous (figure 25) est une photographie d'un film autoradiographique après révélation du marquage DIG de la sonde AMPI utilisée pour génotyper les souris Ms2Yah par la technique de Southern Blot.

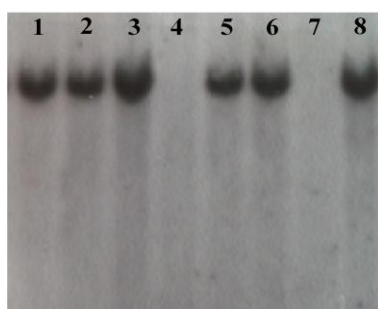


Figure 25 Photographie d'un film autoradiographique révélant le génotype des individus testés. La sonde utilisée est la sonde « AMPI » s'hybridant sur la cassette amplicilline de l'ADN des souris monosomiques. Les individus 1,2,3,5,6 et 8 sont génotypes Ms2Yah alors que les 4 et 7 sont sauvages.

Les nouvelles expériences appliquées sur les souris Ms2Yah ont mis en évidence plusieurs résultats intéressants (cf article annexe). Du point de vue comportemental, même si les souris n'ont pas montré de défaut de coordination motrice en rotarod, il apparaît un déficit d'endurance dans le test du tapis roulant. L'intégrité des muscles ne serait pas touchée dans sa totalité, cependant il existerait une atteinte structurale des fibres nécessaires à l'activité continue (type anaérobie). Egalement, en test de conditionnement à la peur, les souris Ms2Yah présentent un léger délai de réponse au stimulus qui traduit une différence de mémorisation par rapport aux contrôles. Enfin l'analyse de l'expression génique (transcriptome) a révélé des changements chez un ensemble réduit de gènes dont certains peuvent candidater aux phénotypes décrits dans l'article.

Cette étude a démontré que la diminution d'une copie de la région d'intérêt du Mmu17, malgré son impact minimal et localisé, induit une perturbation cellulaire entraînant une baisse de la capacité mnésique ainsi qu'une faiblesse à l'effort prolongé.

II. Etude comportementale de la lignée Tc1Ms2Yah

L'étude du modèle Ms2Yah a montré que la réduction de dose de la région *Abcg1-U2af1* impactait sur la physiologie cellulaire. Une approche additionnelle a été envisagée afin de déterminer l'importance du dosage de cette région dans un modèle plus complet de la trisomie 21 qu'est le modèle Tc1. Pour cela, a été utilisée la publication de Duchon (Duchon, Pothion, et al., 2011) comme guide de notre propre expérience. L'ensemble des tests explorent le comportement sous divers aspects, en comparant les 4 génotypes formant la cohorte : wt, Tc1, Ms2Yah et Tc1Ms2Yah.

A. Génotypage

La première étape est la formation d'une cohorte suffisante pour obtenir des données statistiquement exploitables ; 2 allèles ont dû être détectés afin de différencier les 4 génotypes : l'allèle délété « Ms2Yah » (résultat figure 26) et le transchromosome « Tc1 » (résultat figure 26).

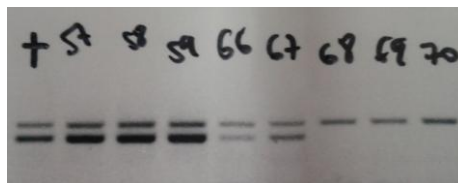


Figure 26 Photographie d'un gel d'agarose révélant le génotype des individus testés. Les primers utilisés révèlent 2 bandes pour les Tc1 et une seule bande pour les sauvages. Les individus 57,58,59,66,67 et le témoin positif (+) sont génotypes Tc1 alors que les 68,69 et 70 sont sauvages.

L'identification de l'ensemble du génotype de chaque individu est donc déterminée d'une part par l'analyse de l'allèle Tc1 par PCR, et d'autre part à travers l'allèle Ms2Yah révélé par le Southern blot. Une fois la création du groupe réalisée, la totalité des animaux a été transférée dans la zone d'hébergement comportementale (12 wt, 11 Ms2Yah, 11 Tc1 et 8 Tc1Ms2Yah).

B. Le champ ouvert (Open-Field)

Nous avons choisi ce test car, sur le fond B6C3B, les animaux porteurs du transchromosome présentaient un pattern exploratoire particulier puisqu'au cours de l'observation les souris passaient autant de temps dans la zone intermédiaire que centrale. Notre fond génétique étant différent (F1B6C3B), nous voulions confirmer, ou découvrir, l'attitude exploratrice des Tc1. Ce test dure trente minutes, pendant lesquelles chaque souris est placée et isolée dans une arène ronde. Elle est libre de tous ses mouvements, et ceux-ci sont enregistrés pendant toute la durée de l'expérience. Plusieurs paramètres vont être analysés : la distance parcourue, la vitesse de déplacement et le temps passé dans les différentes zones de l'arène.

Dans la première analyse, le temps moyen et la distance moyenne parcourue sur la période de trente minutes ont été observés (Figure 27).

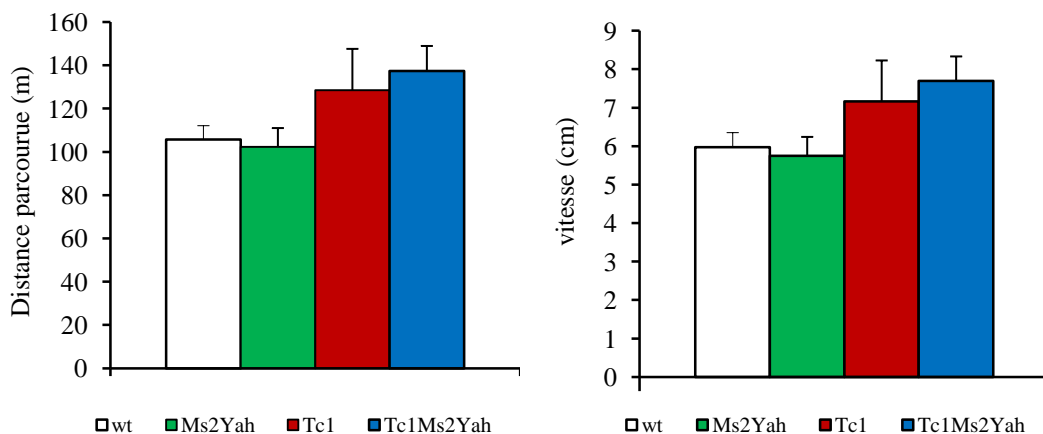


Figure 27 Représentations de la distance moyenne parcourue (à gauche) et la vitesse moyenne (à droite) en session champ ouvert (valeurs moyennes \pm SEM).

Il semble y avoir une différence de patron exploratoire entre les souris wt/Ms2Yah et les souris porteuses du transchromosome Tc1/Tc1Ms2Yah. Un premier test statistique ANOVA à 2 entrées (génotype ; distance ou vitesse) fut appliqué aux données. Les groupes n'ont malheureusement pas de distribution normale ($p < 0.05$), le test de Fisher ne peut être appliqué. Nous nous sommes tournés vers un test ANOVA Kruskal Wallis qui, ne permet pas de déterminer quel groupe est différent des autres, mais toutefois permet d'établir s'il y a oui ou non une différence globale entre les quatre génotypes. L'hypothèse nulle de départ est $H_0 =$ les groupes de génotype sont différents les uns des autres. Le résultat montre que, ni pour la distance ni pour la vitesse, les quatre groupes ne sont pas significativement différents. Pour la

distance, la valeur de l'hypothèse nulle $H=5.724$, donnant une valeur de $p=0.126$ qui est supérieure à l'erreur acceptée $\alpha=0.05$. En ce qui concerne la vitesse, l'hypothèse nulle est $H=5.276$ avec une valeur de $p=0.153$. Ces mêmes paramètres ont donc été observés au cours du temps, afin de constater si un groupe présentait une hyper/hypoactivité à un moment de la session.

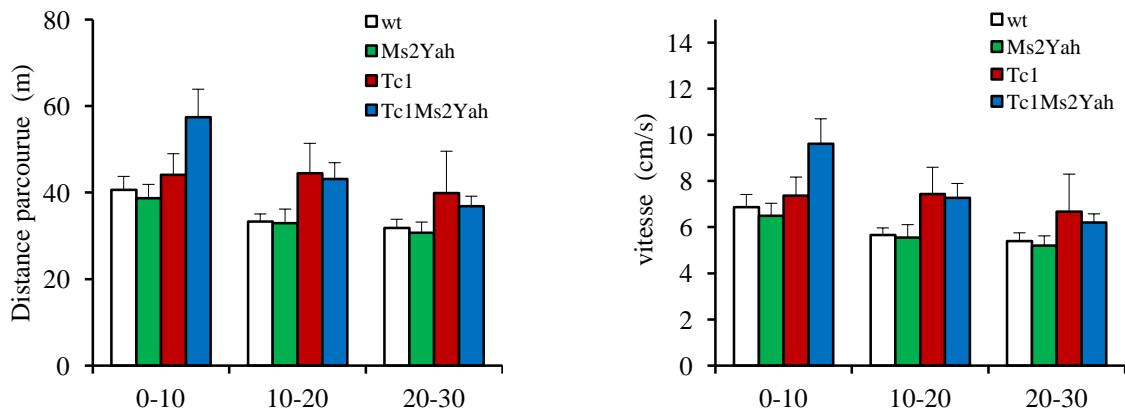


Figure 28 Représentations de la distance parcourue (à gauche) et la vitesse (à droite) par créneau de 10 minutes dans le test en champ ouvert (valeurs moyennes \pm SEM).

En observant ces données de ce point de vue (Figure 28), le groupe des Tc1Ms2Yah apparaît une fois encore différent des autres groupes. Cela est vérifié par une analyse ANOVA avec un test exact de Fisher sur le premier créneau de 10 minutes. Dans cet intervalle, la valeur de $F(3,38)= 3.104$ avec $p=0.038$; il y a donc une différence significative entre les quatre groupes. Par la suite, un test post hoc de comparaison multiple (Student-Newman-Keuls) a été utilisé et il en ressort une différence marquée du groupe Tc1Ms2Yah par rapport aux trois autres groupes (Tc1Ms2Yah versus wt $q=3.614$ avec $p=0.038$; versus Ms2Yah $q=4.032$ avec $p=0.034$ et versus Tc1 $q=2.914$ avec $p=0.046$). Le groupe Tc1Ms2Yah n'a donc pas de comportement hyperactif sur tout le test en champ ouvert, mais l'exposition des souris dans un nouvel environnement induit une hyperactivité à court terme. L'effet de dose génique du modèle Ms2Yah a donc une influence sur l'activité exploratoire des souris, se traduisant par une exploration renforcée. Des gènes présents dans le transchromosome des animaux Tc1 sont donc régulés par les gènes de l'intervalle *Abcg1-U2af1* et, lorsque le nombre de copies de la région est réduit, les gènes du transchromosome révèlent ce nouveau phénotype.

L'analyse de Duchon *et al.* (Duchon, Pothion, et al., 2011) a montré que les souris porteuses du chromosome humain (Tc1 et Tc1Ms4Yah) présentaient une inhibition de

l'anxiété dans le dernier intervalle de temps (20-30 min), lorsque les souris passaient autant de temps dans la zone intermédiaire que périphérique. La même analyse des données a été réalisée sur la cohorte Tc1Ms2Yah (Figure 29).

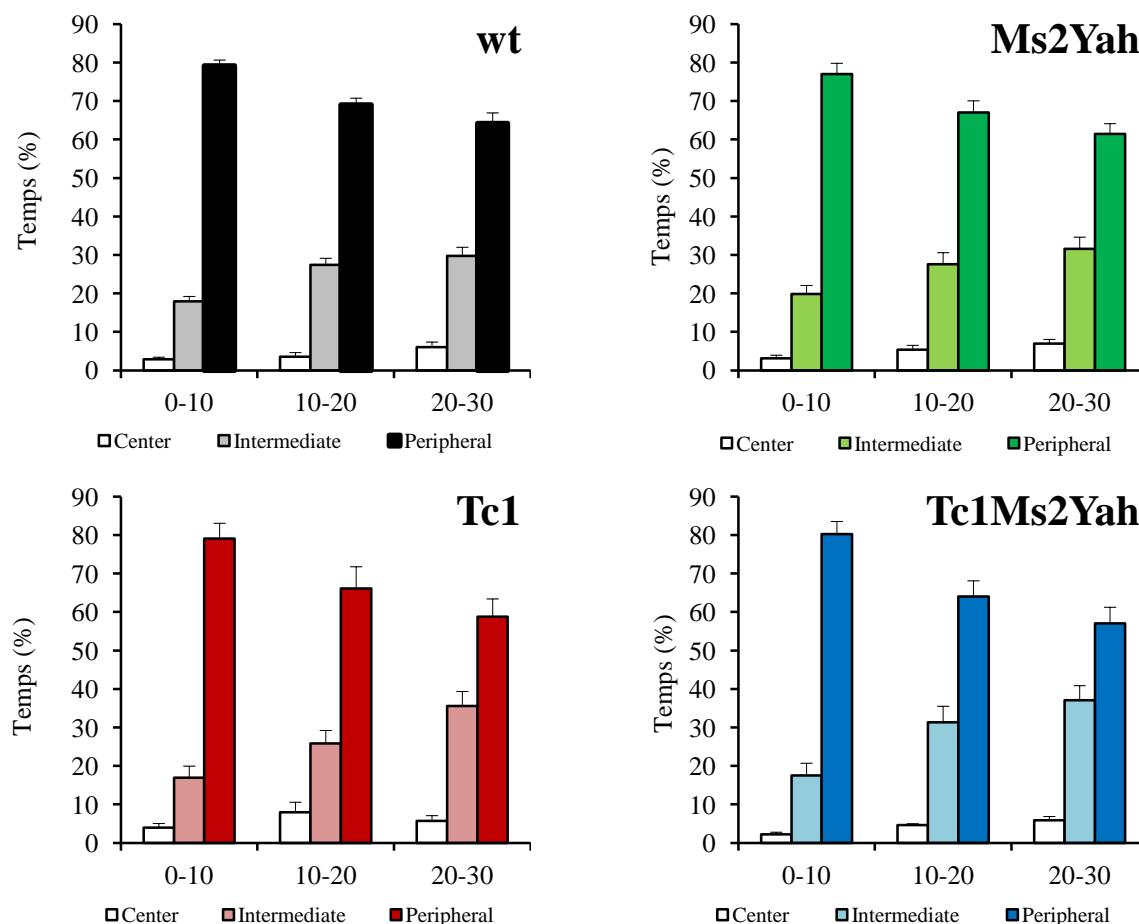


Figure 29 Décryptage des patterns exploratoires des 4 groupes d'animaux, représentés par le pourcentage de temps passé dans chaque zone (périphérique, intermédiaire et centrale), sur les trois intervalles de temps de la session « open field (valeurs moyennes \pm SEM).».

Le premier constat est que, comme attendu, les souris passent plus de temps à la périphérie que dans les deux autres zones dans les dix premières minutes du test. Cela traduit l'anxiété des souris face à un nouvel environnement, l'instinct animal les guidant vers une attitude protectrice (proche des parois) plutôt que de s'exposer au centre de l'arène. Ce comportement va changer au fur et à mesure de la session puisque les souris vont explorer de plus en plus tout l'espace du champ ouvert.

Malheureusement, et contrairement aux résultats de Duchon *et al.*, nous n'observons pas l'effet anxiolytique montré chez les souris qui portent le transchromosome. Les quatre génotypes présentent des phénotypes exploratoires similaires, à savoir une exploration vers

l'intérieur du champ de plus en plus importante dans le temps (Figure 24). En effet, l'évolution du comportement dans cette session ne se fera pas forcément au niveau de l'exploration spatiale horizontale qui se fait surtout dans les dix premières minutes, mais se fera au niveau spatial vertical par le nombre de redressements à différents endroits de l'arène (données non mesurées dans cette expérience).

C. La piscine de Morris

Après avoir observé le comportement exploratoire, nous nous sommes dirigés sur l'analyse des capacités mnésiques : l'étude de Morice (Morice et al., 2008) Pour cela, le choix du test en piscine de Morris s'est avéré le plus judicieux, puisque sous différentes configurations, nous avons pu étudier les fonctions de mémorisation à court terme, long terme et la mémoire de travail. Dans cette tâche, il s'agit pour l'animal d'utiliser une stratégie de mémorisation d'une plateforme non visible à l'aide des repères visuels dans l'espace proche de la piscine. Il existe deux versions de ce test, une première consiste en un apprentissage sur 6 jours de la position de la plateforme, puis dans un second temps, la position est changée et on évalue la capacité à ré apprendre une nouvelle stratégie.

1. Version mémoire spatiale plateforme cachée

Les résultats de la version cachée en premier apprentissage en piscine de Morris sont les suivants (Figure 30) :

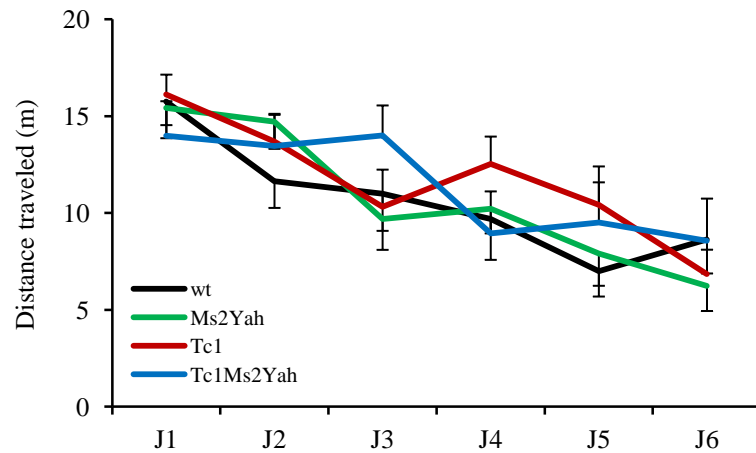


Figure 30 Courbes d'apprentissage au cours du test version plateforme cachée de la piscine de Morris (valeurs moyennes \pm SEM).

L'efficacité de l'apprentissage se traduit par une distance parcourue significativement plus faible entre le premier Jour et le dernier Jour de test. Ce cas se retrouve chez tous les groupes de souris, sans différence entre les génotypes (Test ANOVA avec mesures répétées, variable « Jour » et « génotype », $F(1;38)=64,517$ avec $p<0.001$; l'analyse post-hoc a été réalisée avec la méthode de Tuckey , wt J1 vs J6 : $q=5,643$, $p<0,001$; Ms2Yah J1 vs J6 : $q=6,973$, $p<0,001$; Tc1 J1 vs J6 : $q=7,037$, $p<0,001$; Tc1Ms2Yah J1 vs J6 : $q=3,513$, $p=0,018$).

Vingt-quatre heures après cette première version du test de piscine, la plateforme est retirée et le temps passé dans chaque cadran est mesuré sur une période de 60 secondes (Figure 31).

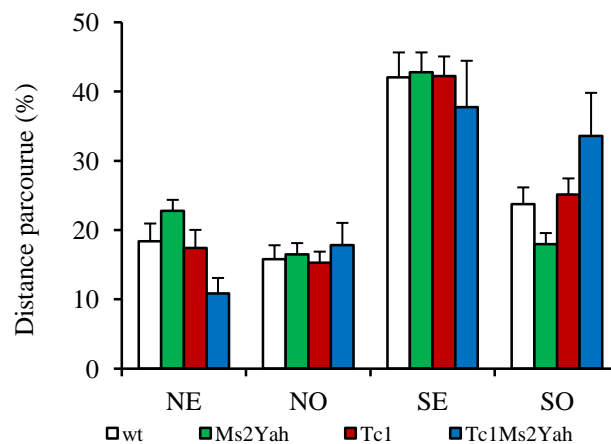


Figure 31 Représentation graphique du premier probe test à travers la mesure de la distance parcourue (en pourcentage) dans l'espace de la piscine, divisé en quadrants (Nord-Est, Nord Ouest, Sud Est, Sud Ouest). Ce probe test est réalisé 24 heures après le dernier jour d'apprentissage (J7) (valeurs moyennes \pm SEM).

Tous les groupes confirment le bon apprentissage de la tâche, puisqu'ils passent préférentiellement plus de temps dans le quadrant cible (SE) que dans le reste de la piscine. (Test ANOVA, variable « quadrant » et « génotype », $F(1;160)=133,768$ avec $p<0.001$; wt Target vs Non-target: $q=9,322$, $p<0,001$; Ms2Yah Target vs Non-target : $q=9,301$, $p<0,001$; Tc1 Target vs Non-target : $q=9,002$, $p<0,001$;Tc1Ms2Yah Target vs Non-target : $q=5,678$, $p<0,001$).

2. Version mémoire spatiale plateforme cachée reversal

Dans cette seconde version, voici les résultats d'apprentissage d'une nouvelle position de plateforme toujours non visible (Figure 32) :

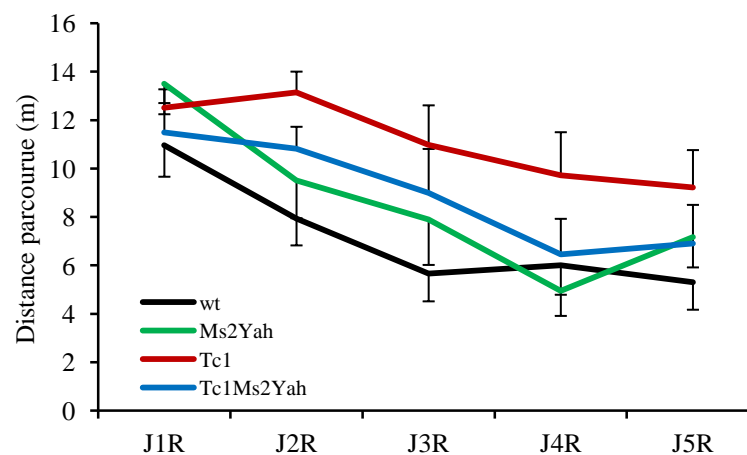


Figure 32 Courbes d'apprentissage au cours du test version reversal plateforme cachée de la piscine de Morris (valeurs moyennes \pm SEM).

Tous les groupes réapprennent avec succès la position de la nouvelle plateforme sauf le groupe Tc1. Les souris dotées du transchromosome seul, présentent un retard de réapprentissage à la limite de la significativité (Test ANOVA avec mesures répétées, variable « jour » et « génotype », $F(1;76)=29,730$ avec $p<0.001$; wt J1R vs J5R : $q=4,743$, $p=0,001$; Ms2Yah J1R vs J5R : $q=5,086$, $p<0,001$; Tc1 J1R vs J5R : $q=2,65$, $p=0,065$; Tc1Ms2Yah J1R vs J5R : $q=3,513$, $p=0,029$).

Si l'on prend en compte chaque journée d'apprentissage, le groupe Tc1 n'a aucune évolution quotidienne dans sa courbe d'apprentissage. Cette mauvaise performance se trouve être significativement différente de la courbe d'apprentissage globale des souris sauvages (Test ANOVA avec mesures répétées, variable « jour » et « génotype », $F(4;152)=12,093$ avec $p<0.001$; génotype « wt vs Tc1 » $q=5,643$ $p=0,002$). Les souris qui portent le

transchromosome ne sont donc pas capables de transférer le processus d'apprentissage, acquis au cours de la première version du test, dans cette version reversal.

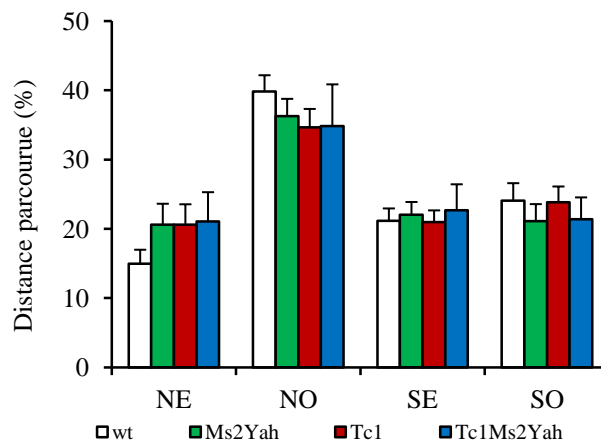


Figure 33 Représentation graphique du second probe test à travers la mesure de la distance parcourue (en pourcentage) en fonction des quadrants. Ce test est réalisé à J13 (valeurs moyennes \pm SEM).

Malgré le délai avéré d'apprentissage par le groupe Tc1, toutes les souris ont montré un intérêt pour le quadrant cible à l'épreuve du probe test en version reversal. La nouvelle position de la plateforme a été mémorisée avec succès par tous les génotypes (Figure 33) (Test ANOVA, variable « quadrant » et « génotype », $F(1;160)=88,878$ $p<0,001$; wt Target vs Non-target: $q=9,383$, $p<0,001$; Ms2Yah Target vs Non-target : $q=6,83$, $p<0,001$; Tc1 Target vs Non-target : $q=5,84$ $p<0,001$; Tc1Ms2Yah Target vs Non-target : $q=5,088$, $p<0,001$).

Enfin, pour évaluer la mémoire spatiale à long terme chez ces souris, un troisième probe test a été réalisé 20 jours après le dernier (soit 33 jours après le début du test). Toujours en ayant pour point de repère le comportement des souris sauvages, le souvenir de la position de la plateforme est ici oublié par ce groupe référence qui passe autant de temps dans les quadrants NO et SE. Ce phénomène se retrouve chez les groupes porteurs du chromosome humain, Tc1 et Tc1Ms2Yah (Figure 34). Seuls les animaux de génotype Ms2Yah ont conservé manifestement le souvenir de la position de la plateforme. Cette performance traduit une meilleure rétention de l'information dans le temps de la part des souris monosomiques par rapport aux autres groupes. (Test ANOVA, variable « quadrant » et « génotype », $F(1;80)=8,462$ $p=0,05$; wt Target vs Non-target: $q=2,121$, $p=0,138$; Ms2Yah Target vs Non-target : $q=3,397$ $p=0,019$; Tc1 Target vs Non-target : $q=1,630$ $p=0,253$; Tc1Ms2Yah Target vs Non-target : $q=1,336$, $p=0,348$).

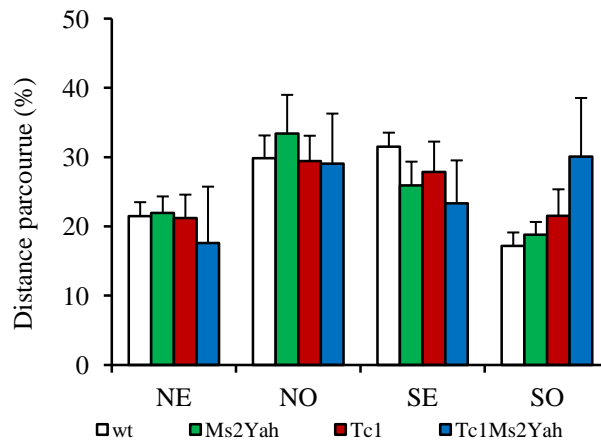


Figure 34 Représentation graphique du troisième probe test à travers la mesure de la distance parcourue (en pourcentage) en fonction des quadrants. Ce test est réalisé 33 jours après le 1^{er} jour de test (valeurs moyennes \pm SEM.)

Dans l'ensemble, les 4 groupes ne présentent pas d'atteinte majeure de la mémoire spatiale. Néanmoins, le groupe Tc1, qui apprend de la même manière que ces congères, expriment toutefois une difficulté dans le transfert du processus d'apprentissage en version reversal. La fonction de stockage reste donc intacte chez tous nos animaux, mais les souris Tc1 ne parviennent pas à utiliser efficacement ce souvenir afin de commencer une nouvelle tâche. Ce déficit paraît compensé lorsqu'une copie de la région *Abcg1-U2af1* est retirée chez ces animaux transchromosomiques.

3. Version mémoire de travail plateforme cachée

Cette dernière version de la piscine de Morris permet donc d'évaluer les performances de la mémoire de travail. Pour cela, un travail quotidien différent est demandé aux souris : chaque animal possède quatre essais par jour pour retrouver la plateforme. Chaque jour la position de la plateforme change ; le but pour l'animal est d'améliorer sa localisation spatiale pour chaque deuxième essai. Au fur et à mesure du test, la distance parcourue et le temps de recherche doivent se réduire (Figure 35).

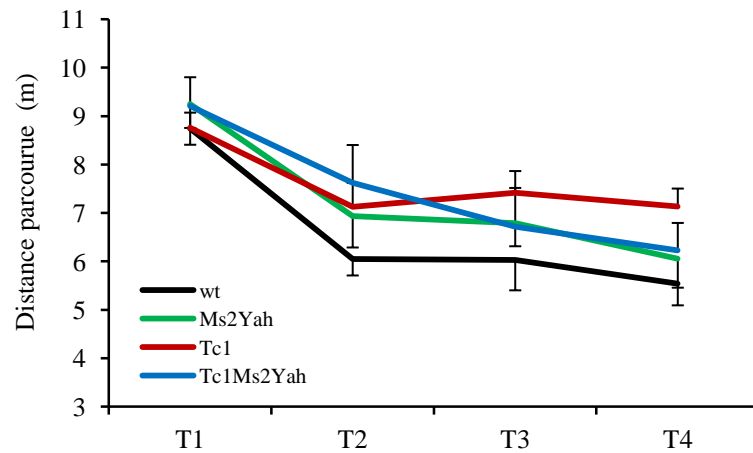


Figure 35 Courbes d'apprentissage au cours du test version mémoire de travail en version plateforme cachée de la piscine de Morris (valeurs moyennes \pm SEM).

Au cours de cette tâche, toutes les souris ont amélioré leurs performances de recherche au fil des jours indépendamment du génotype. L'apprentissage a été efficace pour les souris sauvages, Ms2Yah et Tc1Ms2Yah (Test ANOVA avec mesures répétées, variable « jour » et « génotype », $F(3;111)=33,303$ $p<0,001$; wt Trial 1 vs Trial 4 : $q=7,977$, $p<0,001$; Ms2Yah Trial 1 vs Trial 4 : $q=7,949$, $p<0,001$; Tc1Ms2Yah Trial 1 vs Trial 4 : $q=6,334$, $p<0,001$). Le groupe Tc1 a également appris mais de manière décalée au reste de la cohorte (Trial 1 vs Trial 4 : $q=4,043$, $p=0,026$) ; Il n'y a pas d'écart significatif entre les courbes d'apprentissages, ce qui montre que les souris Tc1 et Tc1Ms2Yah ont une mémoire de travail totalement fonctionnelle.

Comme pour les autres versions, les résultats sont complétés par des probes tests, ici aux jours 1, 4 et 10 (Figure 36).

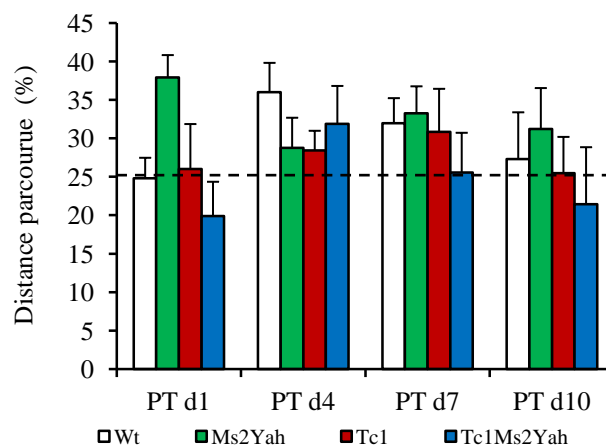


Figure 36 Représentations graphiques des probes tests des jours 1,4 et 10 au cours de la version de mémoire de travail en piscine de Morris ; sont représentées les distances parcourues (en pourcentage) dans les quadrants cibles (valeurs moyennes \pm SEM).

Le premier probe test (PT d1) montre que toutes les souris n'ont pas encore perçu le but de la tâche et sont en dessous de 25% de distance parcourue dans le bon quadrant. Le résultat est confirmé de manière statistique en test ANOVA, variable « quadrant » et « génotype », avec une analyse post hoc de type Student-Newman-Keuls. Tout génotype confondu Target vs Non-target : $q=2,27$ $p=0,109$; seul le groupe Ms2Yah montre une différence avec Ms2Yah Target vs Non-target : $q=5,088$ $p<0,001$). Le second probe test (PT d4) a lieu à la fin du test de mémoire de travail, au moment où les souris sont les plus performantes. Ici, tout génotype confondu, les animaux montrent une différence d'intérêt entre le quadrant cible et les autres quadrants Target vs Non-target : $q=5,467$ $p<0,001$. Par contre, au cas par cas, seules les souris sauvages présentent un intérêt suffisant pour le quadrant cible wt Target vs Non-target : $q=4,699$ $p<0,001$. Le 3^{ème} probe test (PT d7) intervient trois jours après le dernier jour de travail, impliquant une mémorisation à moyen terme. A ce stade, tout génotype confondu, les animaux sont encore capables de se remémorer la dernière position de plateforme Target vs Non-target : $q=3,926$ $p<0,001$; au cas par cas, les groupes wt (Target vs Non-target : $q=2,762$ $p=0,051$) et Ms2Yah (Target vs Non-target : $q=3,187$ $p=0,024$) présentent une différence de distance parcourue significative. Enfin au cours du dernier probe test, neuf jours après le début de l'étude de la mémoire de travail, aucun groupe n'a nagé plus de 25% de la distance totale parcourue dans le quadrant cible.

Etonnement, seules souris sauvages et Ms2Yah ont une mémoire de travail immédiate très performante, et ce dès le premier jour pour le groupe monosomique puisque 35% de leur nage se fait dans le quadrant cible. Globalement, les deux groupes de souris dotées du chromosome humain n'ont pas de préférence de place durant ce test sans plateforme. Ce résultat est contradictoire avec les précédents tests puisque les probes tests des autres versions de la piscine de Morris n'ont montré aucun déficit des souris Tc1 et Tc1Ms2Yah, ni dans l'exercice d'apprentissage impliquant la mémoire de travail. La seule explication plausible ne mettrait pas en cause une déficience de cette mémoire, mais une stratégie de recherche de la plateforme à court terme. En effet, si les souris sauvages et Ms2Yah apprennent au cours du test à rechercher dans le quadrant où se trouvait la plateforme le jour du test, les autres génotypes pourraient adopter une recherche dans les autres quadrants si, dans leur première destination (le quadrant cible), est vide de plateforme. En effet, la position changeant chaque

jour, les souris peuvent orienter leur recherche au cours des probes tests et ne pas persister dans le quadrant d'intérêt.

Finalement, le test en piscine de Morris a permis de révéler une capacité réduite de performance pour les souris transchromosomiques qui nécessitent plus de temps pour optimiser leur mémoire spatiale de travail. A l'inverse, les animaux Ms2Yah sont capables d'acquérir une optimisation rapide de leur mémoire de travail, certainement liée à une modification dans leur plasticité neuronale.

D. Le test de sociabilité

Cet exercice apporte un nouveau point de vue dans l'étude comportementale de la cohorte. En plus de permettre une nouvelle approche de la mémoire à court terme, en impliquant cette fois la mémoire visuelle, cette épreuve met en jeu l'interaction entre animaux et donc la capacité des souris à reconnaître un congénère, par l'odeur et par la communication. Dans l'étude de Duchon, était abordé pour la première fois cette facette de la trisomie 21 humaine ; il y décrit l'incapacité des souris transchromosomiques à reconnaître un spécimen murin, non compensée par la diminution du nombre de copie de la région *Cstb-Prmt2*. Le but de cette épreuve est d'observer s'il y a ou non restauration du phénotype par diminution du nombre de dose de la région *Abcg1-U2af1*. Ce test se déroule en 3 étapes : une première étape d'habituation au contexte, une seconde d'interaction avec un premier congénère et une dernière étape de préférence à la nouveauté, avec un choix pour la souris entre le congénère déjà connu et un nouvel individu..

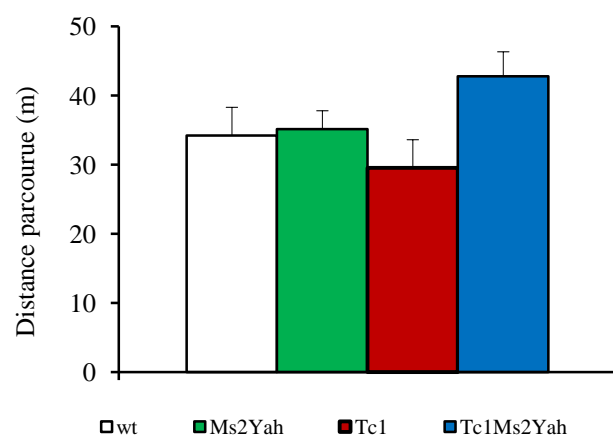


Figure 37 Distance parcourue (en mètres) par les quatre groupes d'animaux au cours de la session d'habituation du test de sociabilité.

Au cours de la séance d'habitué, un des premiers paramètres étudiés est la distance parcourue, qui comme pour le test en champ ouvert, traduit des comportements anxiogènes. Pour cette étape, la durée d'exposition au nouvel environnement est de dix minutes. Il n'y pas de différence entre les souris sauvages et les autres génotypes, néanmoins, les souris Tc1Ms2Yah parcourent plus de distance que les souris Tc1 (test t de student Tc1 versus Tc1Ms2Yah $p=0,027$). En comparant ces résultats au même paramètre lors de la session champ ouvert (premier test comportemental appliqué sur la cohorte), tous les groupes présentent des patterns similaires, en divisant les valeurs de l'open field par 3 afin de comparer des valeurs sur des sessions de 10 minutes, sauf le groupe Tc1. Ces souris qui parcouraient environ 120 mètres sur 30 minutes (soit 40 mètres sur 10 minutes) ne parcourent plus que 30 mètres (Figure 37). Cependant, cet écart n'existe pas entre les sauvages et les Tc1, ce qui permet de conclure que les comportements étudiés dans ce test sont dus au génotype et non au défaut d'exploration. Durant cette habitude, le temps passé dans chaque pièce de l'arène a été mesuré ; aucune différence n'a été détectée (Test ANOVA, variable « zone » et « génotype », $F(1;46)=0,0345$ $p=0,854$), il a donc été établi que les souris ne présentaient pas de préférence de place dans l'arène. Les attitudes mesurées par la suite seront entièrement soumises aux influences du génotype.

La Figure 38 présente les résultats de la première session de mesure qualitative de l'interaction sociale. Dans une des deux chambres est placé le premier congénère ; le temps passé est évalué dans les différentes pièces de l'arène (chambre1, centre et chambre 2).

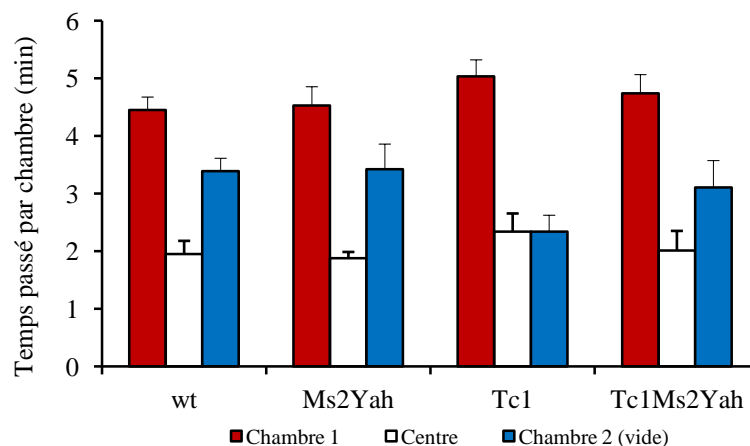


Figure 38 Représentation graphique de la distribution temporelle dans les pièces de l'arène du test de sociabilité pour chaque groupe de souris.

Statistiquement, il y a une différence notable du temps passé entre les différentes zones de l'arène indépendamment du génotype (Test ANOVA, variable « zone » et « génotype »,

F(2;69)=88,987 p<0,001). Pour chaque groupe, les souris passent plus de temps dans la chambre 1 que dans la chambre 2 (wt chambre 1 vs chambre 2: q=3,834, p=0,023; Ms2Yah chambre 1 vs chambre 2: q=3,989, p=0,017; Tc1 chambre 1 vs chambre 2: q=9,737, p<0,001, Tc1Ms2Yah chambre 1 vs chambre 2: q=5,467, p<0,001). Un deuxième paramètre est également mesuré : il s'agit de la quantification du sniffing, temps au cours duquel la souris renifle la zone explorée. Ce « sniffing » montre que les souris explorent davantage la cage de la chambre 1 par rapport à la cage de la chambre inhabitée n°2. Ce phénomène est d'autant plus visible si l'on rapporte ce temps de sniffing en pourcentage de temps passé sur chaque congénère (test t de student : wt p<0,001 ; Ms2Yah p=0,275 ; Tc1 p<0,001 ; Tc1Ms2Yah p=0,022) (Figure 39).

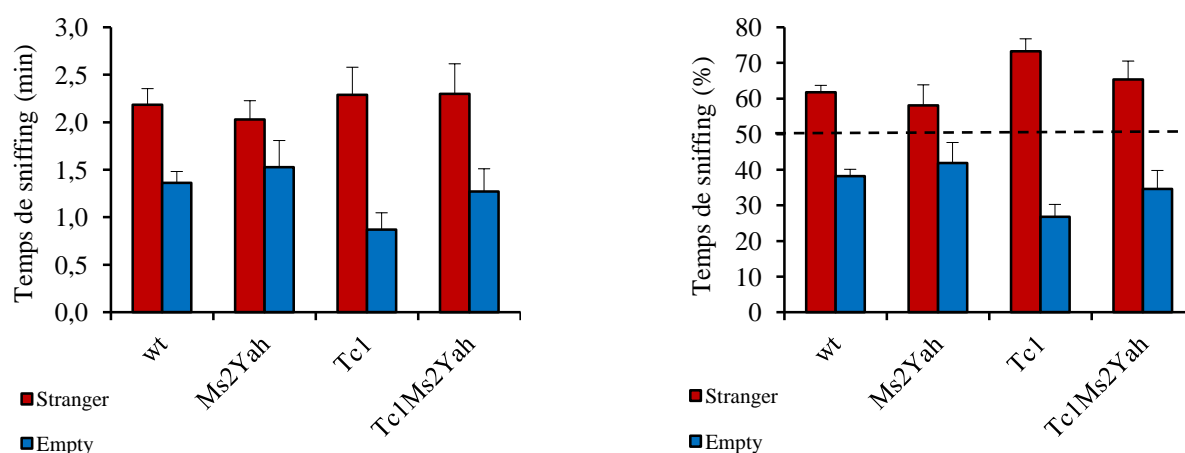


Figure 39 Représentation graphique de la distribution temporelle de sniffing entre la chambre 1 (rouge) où est présente la souris actrice et la chambre 2 (bleu) vide durant cette session. Le graphique de gauche représente le temps de sniffing en minutes alors que celui de droite en pourcentage de temps (50% correspondant à une exploration au hasard).

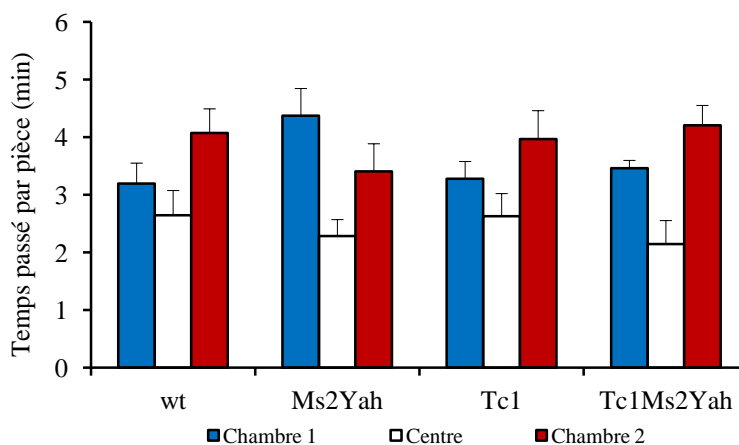


Figure 40 Représentation graphique de la distribution temporelle dans les pièces de l'arène du test de sociabilité pour chaque groupe de souris.

Dans la troisième étape du test de sociabilité, l'animal testé va être confronté à un choix entre la souris avec qui il a agit dans l'étape précédente, et un nouveau congénère placé dans la cage 2. L'instinct de curiosité ainsi que les capacités de mémorisation conduisent normalement l'animal à établir davantage de contacts avec le nouvel individu. L'analyse statistique indique que, globalement, il y a une différence relative au temps passé entre les différentes zones de l'arène indépendamment du génotype (Test ANOVA, variable « zone » et « génotype », $F(2;69)=15,453$ $p<0,001$). Nous ne pouvons pas conclure que les souris reconnaissent le nouveau congénère puisqu'il n'y a pas de différence entre le temps passé dans la chambre 1 et la chambre 2 (wt chambre 1 vs chambre 2: $q=2,257$, $p=0,254$; Ms2Yah chambre 1 vs chambre 2: $q=2,481$, $p=0,193$; Tc1 chambre 1 vs chambre 2: $q=1,772$, $p=0,427$, Tc1Ms2Yah chambre 1 vs chambre 2: $q=1,772$, $p=0,427$). Cela signifie que chaque animal testé visite de manière égale les pièces occupées mais passe plus de temps dans ces chambre que dans la pièce centrale inoccupée (Figure 40). Néanmoins apparaît une tendance : les groupes sauvages, Tc1 et Tc1Ms2Yah ont passé plus de temps dans la pièce du nouveau congénère, au contraire des souris Ms2Yah qui favoriseraient la pièce de la souris familière. Cette remarque se fait aussi grâce à la comparaison du temps passé dans les 2 chambres versus le centre : pour les groupes wt, Tc1 et Tc1Ms2Yah les souris explorent significativement plus la chambre 2 par rapport au centre (wt centre vs chambre 2: $q=3,666$, $p=0,031$; Tc1 centre vs chambre 2: $q=3,440$, $p=0,046$, Tc1Ms2Yah centre vs chambre 2: $q=4,905$, $p=0,003$) alors que les animaux Ms2Yah retournent plus souvent dans la chambre 1 par rapport au centre. Ces différences ne sont plus significatives entre la chambre 2 et le centre en ce qui concerne les souris monosomiques, et inversement pour les 3 autres groupes. Cette tendance est confirmée par le temps et le pourcentage de temps de sniffing attribués aux 2 animaux utilisés pour le test. Ce paramètre de sniffing montre que les souris testées passent autant de temps sur l'un et l'autre des congénères (Figure 41) ; mais en rapportant ce temps en pourcentage relatif sur chacun des congénères, il s'avère effectivement que les temps d'interaction ne sont pas dus au hasard puisque les groupes wt, Tc1 et Tc1Ms2Yah passent 60% du temps en contact avec le nouvel individu, alors que les souris Ms2Yah restent en moyenne plus longtemps en communication avec la souris familière (test t de student : wt $p=0,110$; Ms2Yah $p=0,387$; Tc1 $p=0,142$; Tc1Ms2Yah $p=0,082$).

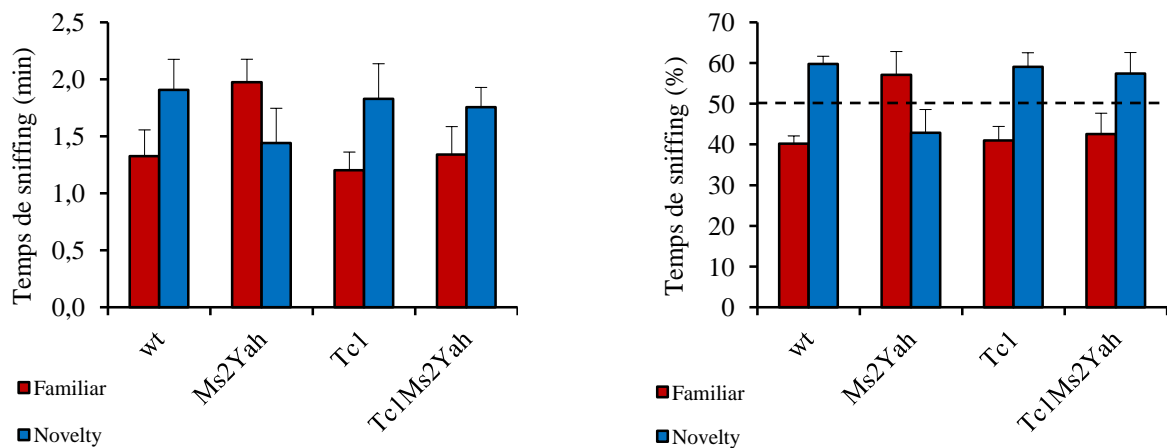


Figure 41 Représentation graphique de la distribution temporelle de sniffing entre la chambre 1 contenant le congénère connu (rouge) et la chambre 2 (bleu) où vient d'être placée la nouvelle souris. Le graphe de gauche représente le temps de sniffing en minutes alors que celui de droite en pourcentage de temps (50% correspondant à une exploration au hasard).

Cette étude a permis d'appréhender un nouveau type de mémoire qu'est la mémoire de reconnaissance, impliquant des processus mnésiques évidemment mais également de la mémorisation olfactive et auditive directement liées aux capacités de sociabilisation des souris. Sur ces aspects, les souris Tc1 et Tc1Ms2Yah ne présentent pas de déficit comparativement aux souris contrôles, ce qui tend à prouver que cette région n'est pas impliquée dans les processus associés à la sociabilité. Or, les souris Ms2Yah n'expriment pas de préférence pour la nouveauté, traduisant un défaut de communication ou de mémorisation qui est reflété par une préférence pour l'individu familier. Ce défaut est donc comblé par des gènes présents dans le transchromosome hors de la région *Abcg1-U2af1*, qui lorsque qu'ils sont en excès, ne représentent pas d'obstacle aux performances cognitives.

E. Le rotarod : test de la barre tournante

Toutes les études portant sur le modèle Tc1 ont montré de très sévères troubles de la coordination et des performances locomotrices (Duchon, Pothion, et al., 2011; Galante et al., 2009). Comme le test précédent, la finalité de cet exercice était de quantifier les performances des individus Tc1Ms2Yah afin de constater un potentiel sauvetage des capacités. Le test de la barre tournante se divise en 2 parties :

- un test de coordination où les animaux doivent rester le plus longtemps possible sur l'axe tournant à vitesse accélérée (4 à 40 rpm en 5 minutes). Cette tâche se

déroule sur 3 jours afin de quantifier l'amélioration des performances au cours de l'entraînement. Appliqué sur la cohorte, ce protocole a révélé 2 profils différents : d'un côté les groupes wt et Ms2Yah ne présentent pas de déficit de coordination tandis que les groupes Tc1 et Tc1Ms2Yah ont quant à eux de grandes difficultés à rester sur l'axe après 1 minute d'effort, soit environ 10 rpm (Figure 42). Au 1^{er} jour de test, il y a déjà une différence significative, au niveau du temps de latence avant la chute des animaux et également la vitesse à laquelle a lieu la chute, entre les porteurs et les non porteurs du transchromosome (Latence : Test ANOVA avec mesures répétées, variable « jour » et « génotype », $F(3;64)=25,932$ $p<0,001$ complété par une analyse post hoc via la méthode Tuckey; wt vs Ms2Yah « jour 1 »: $q=2,651$ $p=0,246$; wt vs Tc1 « jour 1 »: $q=8,427$ $p<0,001$; wt vs Tc1Ms2Yah « jour 1 »: $q=6,918$ $p<0,001$ _ Vitesse : Test ANOVA avec mesures répétées, variable « jour » et « génotype », $F(3;64)=29,272$ $p<0,001$; post hoc wt vs Ms2Yah « jour 1 »: $q=2,621$ $p=0,255$; wt vs Tc1 « jour 1 »: $q=8,984$ $p<0,001$; wt vs Tc1Ms2Yah « jour 1 »: $q=7,409$ $p<0,001$).

Au niveau de l'entraînement, les souris sauvages améliorent leur score (Latence : Test ANOVA avec mesures répétées, variable « jour » et « génotype », wt « jour 1 vs jour 3 »: $q=6,014$ $p<0,001$). Les souris Ms2Yah ne parviennent pas à améliorer leur performance mais maintiennent leurs capacités durant la totalité de la session (Ms2Yah « jour 1 vs jour 3 »: $q=2,947$ $p=0,101$). Enfin les groupes Tc1 et Tc1Ms2Yah n'améliorent en aucune façon leurs faibles capacités originelles (Tc1 « jour 1 vs jour 3 »: $q=2,509$ $p=0,187$; Tc1Ms2Yah « jour 1 vs jour 3 »: $q=2,245$ $p=0,258$).

Ces résultats démontrent d'une part que les gènes du *Mmu17* présent en une seule copie dans le modèle Ms2Yah n'affectent pas la coordination motrice mais ont un impact sur la fonction musculaire immédiate, impliquant les fibres aérobies. Une première hypothèse pourrait être que les muscles aérobies de ces souris possèdent une quantité de fibres limitée par rapport aux wt. Par ailleurs, dans le contexte transchromosomique, la réduction d'une copie de cette même région n'améliore pas les déficits profonds du modèle Tc1.

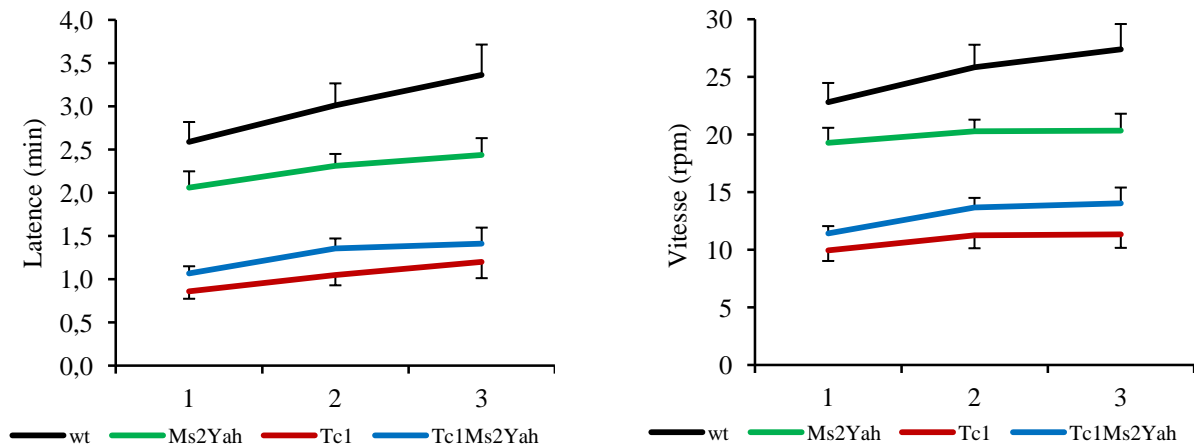


Figure 42 Courbes représentant l'évolution des performances locomotrices sur trois jours d'entraînement (1 à 3) sur un test de maintien statique sur un axe tournant en vitesse accélérée de 4 à 40 rpm. Le graphe de gauche récapitule le temps de chute de chaque génotype en fonction des jours, et le graphe de droite représente la vitesse de chute de chaque génotype en fonction des jours.

- Le second test sur rotarod est un test d'endurance propre : chaque souris de la cohorte est placée sur le rod durant 2 minutes maximum à 7 vitesses consécutives (Figure 43). Les résultats enregistrés sont les temps de chute de chaque souris pour chaque vitesse (2 essais par vitesse). Le premier constat, qui concorde avec le résultat précédent, est que les souris wt et Ms2Yah performent de la même manière (Test ANOVA, variable « génotype », « vitesse », $F(3;224)=42,656$ $p<0,001$; post hoc Tuckey : wt vs Ms2Yah $q=3,493$ $p=0,065$). Cela permet d'évaluer la portance du déficit visible au test précédent, qui, dans un exercice physique inférieur à 2 minutes, n'apparait pas. L'hypothèse d'une quantité limitée de fibres disponibles est donc toujours valable.

Le second constat est que les souris Tc1 ne sont pas capables d'effectuer le test au même niveau que les wt (wt vs Tc1 $q=15$ $p<0,001$). Ce résultat confirme aussi les études connues du modèle qui présente des troubles locomoteurs sévères.

Enfin, concernant le profil des souris Tc1Ms2Yah, la situation est intermédiaire aux sauvages et Tc1. En effet, globalement les souris Tc1Ms2Yah performent moins bien que les wt (wt vs Tc1Ms2Yah $q=8,389$ $p<0,001$). Parallèlement, ce même groupe de souris performent mieux que les souris Tc1 mais moins bien que les Ms2Yah (Tc1Ms2Yah vs Ms2Yah $q=11,599$ $p<0,001$; Tc1Ms2Yah vs Tc1 $q=5,472$ $p<0,001$). Bien que les groupes porteurs du transchromosome chutent de manière similaire à partir de 16 rpm, à des vitesses relativement faibles (4 et 10 rpm), les animaux Tc1Ms2Yah se maintiennent plus longtemps sur le rod que les souris Tc1 (Tc1Ms2Yah vs Tc1 « 4 rpm » $q=3,482$ $p=0,066$ confirmé en

test t de student $p=0,033$; Tc1Ms2Yah vs Tc1 « 10 rpm » $q=4,766$ $p=0,004$ confirmé en test t de student $p=0,014$).

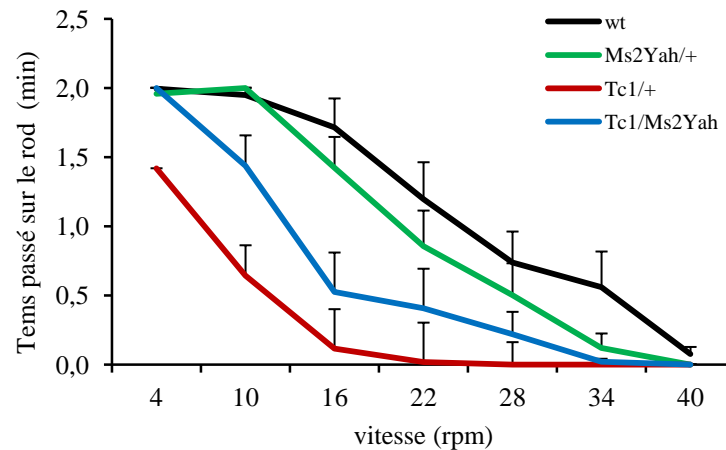


Figure 43 Courbes représentant l'évolution des performances locomotrices à vitesses constantes imposées (4, 10, 16, 22, 28, 34, 40 rpm).

Après la phase d'entraînement, l'implication de la région *Abcg1-U2af1* semblait être mineure, mais au vu des résultats de la phase de test en vitesse constante, il semblerait que cette région modère de manière non négligeable les effets du transchromosome. Le modèle Ts1Yah n'exprimant pas de défaut locomoteur, cette région en 3 copies ne fournit pas à elle seule le phénotype des Tc1. Néanmoins, l'effet de dose du nombre de copies régule l'activité génique des autres gènes en cis/trans. A ce niveau, 2 choix ou combinaisons se définissent : soit la réduction de copie de l'intervalle *Mmu17* modifie l'expression des gènes murins synténiques au *Hsa21* ; soit ce même phénomène agit sur l'expression des gènes du transchromosome. S'il semble que les protéines formées à partir du chromosome humain soient fonctionnelles, on ne sait rien sur la régulation potentielle des murins sur les gènes humains.

Ce second projet, jugeant l'influence de la région *Abcg1-U2af1* dans un contexte de trisomie humanisée, a montré que cet intervalle génétique avait un plus grand rôle qu'attendu eu égard les résultats obtenus sur le modèle monosomique seul. Le rôle de ces gènes, dans ce contexte trisomique, met en jeu d'importants mécanismes cognitifs et locomoteurs ; de plus, ces gènes régulent l'activité du reste du génome du Hsa21, situés sur les Mmu10 et 16, démontrés par des sauvetages phénotypiques. Néanmoins, l'analyse du comportement social n'a pas montré de désordre relationnel, hormis chez les individus Ms2Yah. Le dosage de la

région d'intérêt à 2 ou 3 copies ne désorganise pas la fonction cérébrale employée, mais une seule copie perturbe fortement l'interaction sociale. Le maintien de la balance génétique de la région *Abg1-U2af1* nous paraît donc primordial aux vues de nos expériences, et nous pouvons confirmer qu'avec la DSCR, cet intervalle du Mmu17 compte désormais dans les régions à rôles clés du tableau clinique du syndrome de Down.

III. Implication de la CBS dans les phénotypes cognitives du syndrome de Down

Les résultats récoltés dans les 2 projets précédents sur le modèle Ms2Yah additionnés aux résultats publiés sur le modèle Ts1Yah confortent notre opinion selon lequel cette région *Abcg1-U2af1* joue un rôle très important dans la physiopathologie de la trisomie 21. Les données connues sur le modèle trisomique coïncident pour dire que la mémoire à court terme est altérée chez ces souris. C'est pourquoi, une des premières expériences que nous avons initiée fut une analyse du transcriptome de ces souris afin d'évaluer l'impact de la région sur le reste du génome, à la manière de l'étude réalisée chez les Ms2Yah.

A. Ts1Yah: Analyse du profil d'expression des cellules de l'hippocampe.

1. Analyse des données brutes « Robut Multiarray Average »

Les données brutes, extraites du traitement informatique de la fluorescence émise par les sondes, sont analysées manuellement par la même technique de normalisation que pour l'étude du modèle Ms2Yah. Brièvement, chaque valeur de sonde pour chaque individu est normalisée grâce à une référence (désignation aléatoire d'un individu wt) puis, est calculé le Fold Change, ratio d'expression entre la moyenne des signaux wt et Ts1Yah. Les gènes retenus sont les gènes statistiquement dérégulés (test t de student $p < 0,05$) et dont la valeur du Fold Change est comprise entre 0,8 et 1,2.

Pour cette étude, un seuil de détection de fluorescence a été défini correspondant environ au niveau de fluorescence des 30% de gènes les moins exprimés ; il a ici une valeur RMA de 4,15 ; 25930 gènes sont considérés exprimés par les cellules de l'hippocampe. De ces gènes,

928 gènes varient de manières importantes dont 447 de manière significative. Finalement, sur ce dernier pool, 63 ne sont pas codant à ce jour, il en résulte donc une table de 384 gènes statistiquement dérégulés dans l'hippocampe des souris Ts1Yah. Parmi ce pool final, 15 gènes se trouvent statistiquement sous exprimés (groupe 1) et donc 369 gènes sont surexprimés (groupe 2). La figure 44 présente le top 10 de chaque groupe, le total est présent en annexe.

| Gp | Probe ID | Gene Name | Chr | wt | Ts1Yah | FC | Test Post Hoc |
|-------|--------------|----------------------|-----|-----------|------------|--------------|---------------|
| | | | | mean±sem | mean±sem | | |
| 1 | 1440413_at | <i>Vwc2l</i> | 1 | 1,86±0,34 | 1,26±0,27 | 0,68 | ** |
| 1 | 1425483_at | <i>Tox</i> | 4 | 1,41±0,21 | 1,04±0,22 | 0,74 | * |
| 1 | 1422160_at | <i>H2-T24</i> | 17 | 0,87±0,08 | 0,64±0,05 | 0,74 | ** |
| 1 | 1455719_at | <i>Tubb5</i> | 17 | 0,99±0,02 | 0,74±0,05 | 0,74 | ** |
| 1 | 1439525_at | <i>1700066D14Rik</i> | UN | 0,94±0,06 | 0,71±0,06 | 0,76 | * |
| 1 | 1422877_at | <i>Pcdhb12</i> | 18 | 0,9±0,04 | 0,69±0,04 | 0,77 | ** |
| 1 | 1451751_at | <i>Ddit4l</i> | 3 | 1,08±0,19 | 0,84±0,12 | 0,78 | * |
| 1 | 1423760_at | <i>Cd44</i> | 2 | 1,25±0,2 | 0,98±0,15 | 0,78 | * |
| 1 | 1449875_s_at | <i>LOC100044190</i> | UN | 1,1±0,07 | 0,86±0,07 | 0,78 | * |
| 1 | 1450750_a_at | <i>Nr4a2</i> | 2 | 0,9±0,1 | 0,71±0,15 | 0,79 | * |
| ----- | | | | | | | |
| 2 | 1430379_at | <i>5830411K21Rik</i> | UN | 0,8±0,12 | 1,34±0,15 | 1,68 | * |
| 2 | 1429906_at | <i>A930035E12Rik</i> | UN | 0,87±0,14 | 1,48±0,19 | 1,71 | ** |
| 2 | 1459369_at | <i>Epha6</i> | 16 | 0,77±0,14 | 1,35±0,15 | 1,75 | ** |
| 2 | 1429703_at | <i>2900072G11Rik</i> | UN | 0,73±0,15 | 1,29±0,24 | 1,77 | ** |
| 2 | 1445695_at | <i>Atxn1</i> | 13 | 0,98±0,07 | 1,76±0,24 | 1,79 | ** |
| 2 | 1454592_at | <i>9430012M22Rik</i> | UN | 0,84±0,16 | 1,51±0,17 | 1,79 | ** |
| 2 | 1442924_at | <i>Clstn2</i> | 9 | 0,89±0,16 | 1,68±0,41 | 1,88 | * |
| 2 | 1454472_at | <i>2900092N22Rik</i> | UN | 0,78±0,11 | 1,62±0,38 | 2,07 | * |
| 2 | 1420516_at | <i>α</i> | 2 | 0,85±0,11 | 4,2±0,64 | 4,93 | ** |
| 2 | 1458719_at | <i>Glp1r</i> | 17 | 0,71±0,12 | 16,81±2,58 | 23,68 | *** |

Figure 44 Table recensant les tops 10 des gènes sur/sous exprimés de manière significative dans l'hippocampe dans souris Ts1Ya ; la totalité de la table est regroupée en annexe (figure 68 p.125).

Parmi ces gènes, nous pouvons noter, et cela confirme les résultats de l'article de Lopes et al., la présence des gènes de la région du *Mmul7* comme *Cbs* (FC=1,53 test t de student p=0,0001), *Wdr4* (FC=1,30 test t de student p=0,0007), *Ndufv3* (FC=1,36 test t de

student $p=0,0007$) ou *Pde9a* (FC=1,42 test t de student $p=0,0259$), tous candidats au phénotypes des souris trisomiques partielles.

La liste de ces gènes a été utilisée par un logiciel de clustering (Cluster3© De hong et al. 2004) dans le but d'extraire des groupes (« clusters ») de gènes ayant les mêmes variations entre les génotypes. Malheureusement, avec une analyse centrée sur les puces et les gènes normalisés, il n'y a pas de clusters qui se dégagent de la figure 4, hormis la petite région centrale de 15 gènes, qui sont parfaitement sous-exprimés chez les Ts1Yah. Parmi ces gènes nous trouvons *Crhr1*, le récepteur de l'hormone corticotrope, très importante dans toutes les régulations hormonales et aussi *Kcnj9*, canal ionique très actifs dans le cerveau. Cependant, ces gènes, clusterisés par leur expression n'ont aucun point commun, que ce soit en termes de voie de signalisation ou position chromosomique.

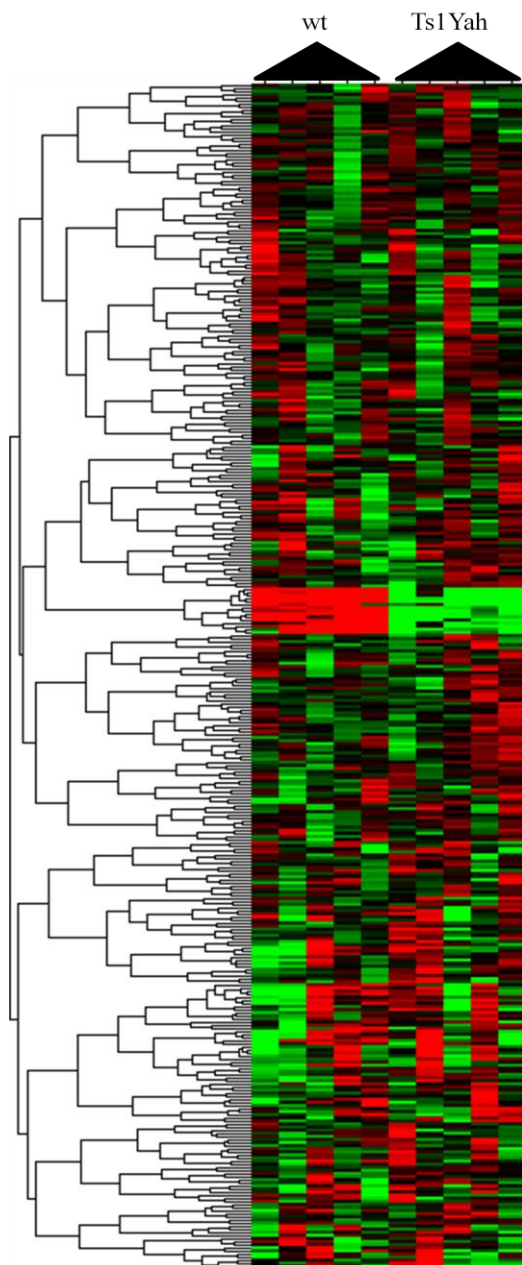


Figure 45 Représentation de l'ensemble des gènes dérégulés selon des critères précis et choisis (cf matériel et méthode) sous forme de clusters ; en vert sont répertoriés les gènes statistiquement sous exprimés et en rouge les surexprimés. La liste nominale des gènes est indiquée en annexe page....

2. Evaluation des fonctions physiologiques altérées via le logiciel D.A.V.I.D. (huang et al. 2009)

Ce logiciel, disponible gratuitement, a permis d'établir un aperçu de l'impact fonctionnel de la dérégulation des gènes sur l'activité de l'hippocampe. A partir de la liste des gènes sélectionnés, D.A.V.I.D. ® étudie les interactions communes répertoriées dans la base de données et extrait un listing des différentes catégories d'entités biologiques altérées auxquelles sont associées un score d'enrichissement qui traduit le nombre de gènes impactés dans cette entité. Cette valeur est tirée de la méthode EASE, version plus ancienne de

DAVID. Un second critère est également donné, la p-value, reflétant la pertinence de l'altération engendrée. Le dernier critère pris en compte est la FDR (False Discovery Rate) qui évalue la potentialité d'avoir un résultat faux positif.

Le tableau suivant représente le top 3 des entités biologiques altérées, classées selon leur score d'enrichissement. Pour chaque entité (cluster), correspond plusieurs altérations de type variable (morphologie, fonction, liaison...). A chaque altération est associée le nombre d'éléments perturbés dans cette voie et son pourcentage, puis les différents calculs statistiques permettant de déterminer la significativité du résultat. Pour plus d'informations, se référer au site <http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>.

| Identification | Nb | % | DE | Bonferroni | Benjamini | FDR |
|--|----|-----|-------|------------|-----------|-------|
| Cluster 1 Score d'enrichissement: 4,310 | - | - | - | - | - | - |
| GO:0048812~neuron projection morphogenesis | 13 | 3,4 | 5,255 | 0,008 | 0,008 | 0,011 |
| GO:0032989~cellular component morphogenesis | 18 | 4,8 | 3,648 | 0,011 | 0,005 | 0,014 |
| GO:0000904~cell morphogenesis involved in differentiation | 14 | 3,7 | 4,698 | 0,011 | 0,004 | 0,014 |
| GO:0048667~cell morphogenesis involved in neuron differentiation | 13 | 3,4 | 5,082 | 0,012 | 0,003 | 0,015 |
| GO:0031175~neuron projection development | 14 | 3,7 | 4,569 | 0,015 | 0,003 | 0,019 |
| GO:0043005~neuron projection | 14 | 3,7 | 4,494 | 0,003 | 0,002 | 0,018 |
| GO:0007409~axonogenesis | 12 | 3,2 | 5,237 | 0,022 | 0,004 | 0,029 |
| GO:0048858~cell projection morphogenesis | 13 | 3,4 | 4,578 | 0,033 | 0,004 | 0,044 |
| GO:0000902~cell morphogenesis | 16 | 4,2 | 3,684 | 0,035 | 0,004 | 0,047 |
| GO:0042995~cell projection | 21 | 5,6 | 2,872 | 0,009 | 0,002 | 0,049 |
| GO:0030030~cell projection organization | 16 | 4,2 | 3,568 | 0,051 | 0,005 | 0,069 |
| GO:0032990~cell part morphogenesis | 13 | 3,4 | 4,362 | 0,052 | 0,004 | 0,070 |
| GO:0006928~cell motion | 17 | 4,5 | 3,295 | 0,069 | 0,005 | 0,095 |
| GO:0048666~neuron development | 14 | 3,7 | 3,411 | 0,255 | 0,015 | 0,386 |
| GO:0030424~axon | 8 | 2,1 | 5,880 | 0,098 | 0,011 | 0,530 |
| GO:0007411~axon guidance | 8 | 2,1 | 5,807 | 0,421 | 0,025 | 0,716 |
| GO:0030182~neuron differentiation | 16 | 4,2 | 2,853 | 0,455 | 0,026 | 0,794 |
| GO:0021953~central nervous system neuron differentiation | 5 | 1,3 | 8,469 | 0,966 | 0,103 | 4,350 |

| | | | | | | | |
|---|--------------------------------------|----|------|-------|------------|-----------|------------|
| Cluster 2 | Score d'enrichissement: 3,764 | - | - | - | - | - | - |
| zinc-finger | | 35 | 9,3 | 2,084 | 0,014 | 0,005 | 0,079 |
| GO:0046872~metal ion binding | | 83 | 22,0 | 1,447 | 0,030 | 0,010 | 0,122 |
| GO:0008270~zinc ion binding | | 53 | 14,0 | 1,690 | 0,031 | 0,008 | 0,126 |
| GO:0043169~cation binding | | 83 | 22,0 | 1,434 | 0,042 | 0,008 | 0,170 |
| metal-binding | | 60 | 15,9 | 1,604 | 0,038 | 0,010 | 0,215 |
| GO:0043167~ion binding | | 83 | 22,0 | 1,416 | 0,065 | 0,011 | 0,269 |
| zinc | | 46 | 12,2 | 1,749 | 0,046 | 0,009 | 0,264 |
| GO:0046914~transition metal ion binding | | 57 | 15,1 | 1,467 | 0,446 | 0,071 | 2,341 |
| Cluster 3 | Score d'enrichissement: 3,161 | | | | | | |
| GO:0045202~synapse | | 20 | 5,3 | 4,931 | 5,0844E-06 | 5,084E-06 | 2,6069E-05 |
| GO:0030054~cell junction | | 19 | 5,0 | 3,179 | 0,007 | 0,002 | 0,035 |
| GO:0044456~synapse part | | 11 | 2,9 | 4,080 | 0,087 | 0,013 | 0,466 |
| cell junction | | 13 | 3,4 | 2,378 | 0,870 | 0,107 | 10,853 |
| synapse | | 9 | 2,4 | 3,030 | 0,898 | 0,108 | 12,076 |
| GO:0045211~postsynaptic membrane | | 6 | 1,6 | 3,745 | 0,996 | 0,208 | 24,926 |
| postsynaptic cell membrane | | 4 | 1,1 | 2,607 | 1,000 | 0,631 | 93,958 |

Figure 46 Table recensant le top 3 des clusters perturbés dans l'hippocampe des Ts1Yah, après analyses par le logiciel D.A.V.I.D.

Ces analyses moléculaires sur l'activité génique de l'hippocampe des Ts1Yah nous ont permis de conclure plusieurs faits : L'effet de l'addition d'une dose de la région, comparativement à la réduction dans le modèle Ms2Yah, induit plus d'effets dans le génome ; certes, 384 sondes ont été détectées statistiquement différentes entre les Ts1Yah et wt, alors qu'entre les Ms2Yah et wt, seulement 171 sondes ont été extraites de l'analyse. D'autre part, les gènes dont l'expression est modifiée, sont plus fortement associés à des voies de signalisation, comme montré avec le logiciel DAVID. Enfin, un résultat comparable dans les 2 modèles de souris, est que la région d'intérêt est soit sous exprimée (Ms2Yah), soit surexprimée (Ts1Yah) de manière significative. Nous pouvons donc penser que les gènes de la région peuvent être de bons gènes candidats aux phénotypes, puisque le déséquilibre de la balance transcriptionnelle induit dans tous les cas des dysfonctionnements chez la souris. Nous nous sommes donc tournés vers les données bibliographiques disponibles pour choisir les meilleures options à considérer. Parmi celles-ci, comme décrit dans l'introduction de ce manuscrit, le gène *Cbs* nous apparut comme le premier choix de gène pouvant être à l'origine des phénotypes cognitifs du modèle Ts1Yah.

B. Gène candidat *Cbs* : analyse comportementale de la cohorte Ts1Yah x *Cbs* +/-

Une cohorte a été formée afin d'étudier le comportement des animaux portant la duplication en cis de la région *Abcg1-U2af1* associée à la délétion d'un allèle *Cbs*. Ces individus présentent donc 3 copies de tous les gènes de la région d'intérêt, sauf le *Cbs* qui n'est représenté que par 2 copies. L'élaboration de ce nouveau génotype a pour but d'observer de potentielles restaurations des phénotypes exprimés par les Ts1Yah. Ce groupe de souris sera donc comparé aux Ts1Yah et *Cbs* +/-, pour s'assurer que, d'une part les modifications comportementales des Ts1Yah sont toujours présentes, mais aussi que les *Cbs* +/- ne démontrent quand à elles, pas de phénotype particulier. Enfin ces trois groupes sont comparés à un groupe de souris wt qui définissent l'activité basale de référence pour chaque test.

1. Génotypage

Comme pour le projet Tc1xMs2Yah, la première étape est la formation d'une cohorte suffisante pour obtenir des données statistiquement exploitables ; 2 allèles ont dû être détectés afin de différencier les 4 génotypes : l'allèle délété « Ts1Yah » et l'allèle *Cbs* muté (résultats figure 47).

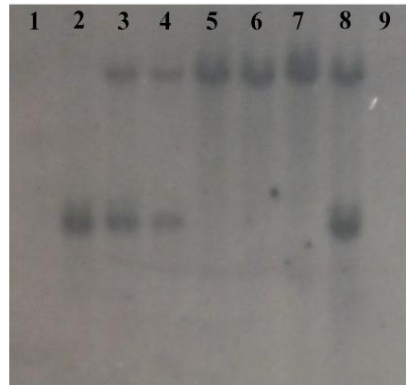


Figure 47 Photographie d'un film autoradiographique révélant le génotype des individus testés. Les ADN ont été digérés par l'enzyme *EcoRI* et révélés par la sonde AMPI. La digestion autour de la cassette Néomycine chez les individus Ts1Yah fait apparaître une bande de grande taille (environ 10kb) et une bande plus petite (environ 3200kb). Les individus 1 et 9 sont génotypés wt ; l'individu 2 est *Cbs* +/- ; les individus 5,6 et 7 sont Ts1Yah et les individus 2,3 et 8 sont des individus dits « doubles mutants » Ts1Yah/*Cbs*.

Une fois la création du groupe réalisée, la totalité des animaux a été transférée dans la zone d'hébergement comportementale, au minimum 1 semaine avant le début des tests.

2. Variation de poids

Le poids des animaux a été mesuré à la fin de tous les tests, et un mois après le dernier test. Le poids moyen (Figure 48) montre que les souris Cbs +/- ont un poids statistiquement plus faible que les souris contrôles et trisomiques (test t de student wt vs Cbs +/- $p=0,029$; Cbs +/- vs Ts1Yah $p=0,044$). Les animaux Ts1Yah/Cbs ont un poids moyen nettement inférieur aux wt et aux Ts1Yah mais pas de manière significative (test t de student wt vs Ts1Yah/Cbs $p=0,081$; Ts1Yah vs Ts1Yah/Cbs $p=0,102$)

| Génotype | Poids moyen (g) | S.E.M. |
|------------|-----------------|--------|
| wt | 37,9 | 0,64 |
| Cbs +/- | 35,1 | 1,01 |
| Ts1Yah | 37,9 | 0,89 |
| Ts1Yah/Cbs | 35,5 | 1,07 |

Figure 48 Tableau récapitulatif de la valeur du poids moyen des souris, après la période de tests comportementaux (souris âgées de 26 semaines)..

La CBS, par son rôle dans la formation de l'athérosclérose, agit indirectement sur le métabolisme des triglycérides, et pourrait donc agir sur la régulation du poids, ou de la prise alimentaire.

3. Test en champ ouvert

Ce test, nécessaire à la réalisation du test de reconnaissance d'objets, a été réalisé pour confirmer que les souris Ts1Yah explorent leur environnement de la même manière que le groupe contrôle. Les animaux sont donc placés individuellement dans les arènes pendant 30 minutes. Dans ce test, tous les groupes se comportent de la même manière sauf les doubles transgéniques Ts1Yah/Cbs. Ces souris parcourent plus de distance dans l'arène à cause d'une vitesse exacerbée (Figure 49).

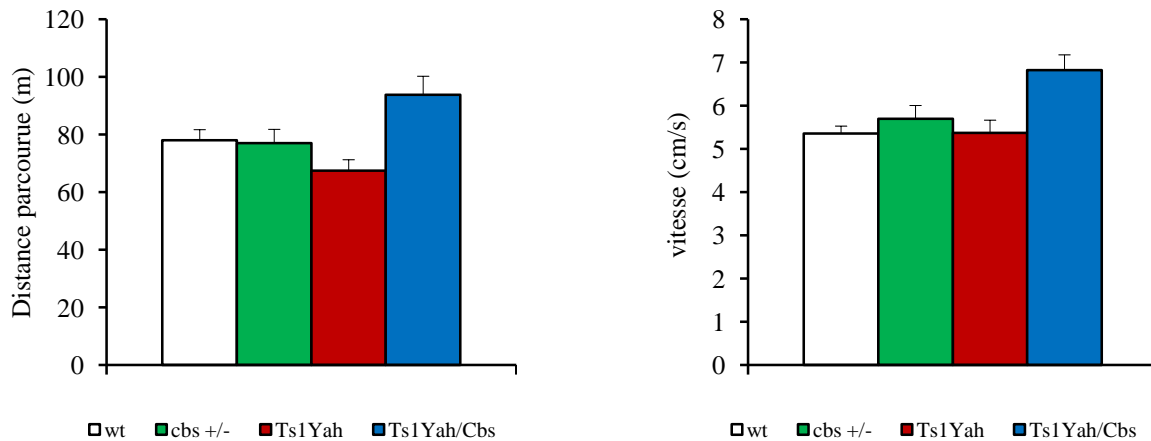


Figure 49 Représentations de la distance moyenne parcourue (à gauche) et la vitesse moyenne (à droite) en session champ ouvert (souris âgées de 12 semaines – fond C57BL/6J ; valeurs moyennes \pm SEM).

L'analyse statistique par un test t de student (wt vs Ts1Yah/Cbs $p < 0,001$; Cbs +/- vs Ts1Yah/Cbs $p = 0,026$; Ts1Yah vs Ts1Yah/Cbs $p = 0,005$) confirme les résultats du graphique, à savoir que les souris Ts1Yah/Cbs se comportent différemment des 3 autres groupes. Ce caractère s'apparente à un syndrome d'hyperactivité. Ce phénomène n'est pas lié aux modifications génétiques puisque les souris trisomiques et mutées parcourent la même distance que les souris sauvages.

En analysant les patterns d'exploration selon les zones de l'arène, la majorité de la distance supplémentaire parcourue par le groupe Ts1Yah/Cbs a été mesurée dans la zone périphérique (Figure 50). Dans cette zone, ce groupe de souris s'est déplacé plus activement que les autres génotypes (Test ANOVA, variables « intervalle » et « génotype » $F(3 ; 165) = 15,7$ et $p < 0,001$. Post hoc Tuckey méthode : wt vs Ts1Yah/Cbs « 0-10 min » $q = 5,647$ $p < 0,001$; cbs +/- vs Ts1Yah/Cbs $q = 5,536$ $p < 0,001$; Ts1Yah vs Ts1Yah/Cbs $q = 6,74$ $p < 0,001$. Pour « 10-20 min » : wt vs Ts1Yah/Cbs $q = 4,117$ $p = 0,019$; Ts1Yah vs Ts1Yah/Cbs $q = 6,01$ $p < 0,001$. Enfin pour « 20-30 min », seul Ts1Yah vs Ts1Yah/Cbs $q = 3,956$ $p = 0,026$). Dans les zones intermédiaire et centrale, le groupe Ts1Yah/Cbs ne parcourt pas plus de distance que les autres groupes (Zone intermédiaire : test ANOVA, variables « intervalle » et « génotype » $F(3 ; 165) = 2,032$ et $p = 0,111$; zone centrale $F(3 ; 165) = 1,559$ et $p = 0,201$).

Cela signifie que malgré le caractère hyperactif des souris, leur comportement instinctif n'est pas changé puisqu'aucun comportement anxiogène ou anxiolytique ne s'est manifesté.

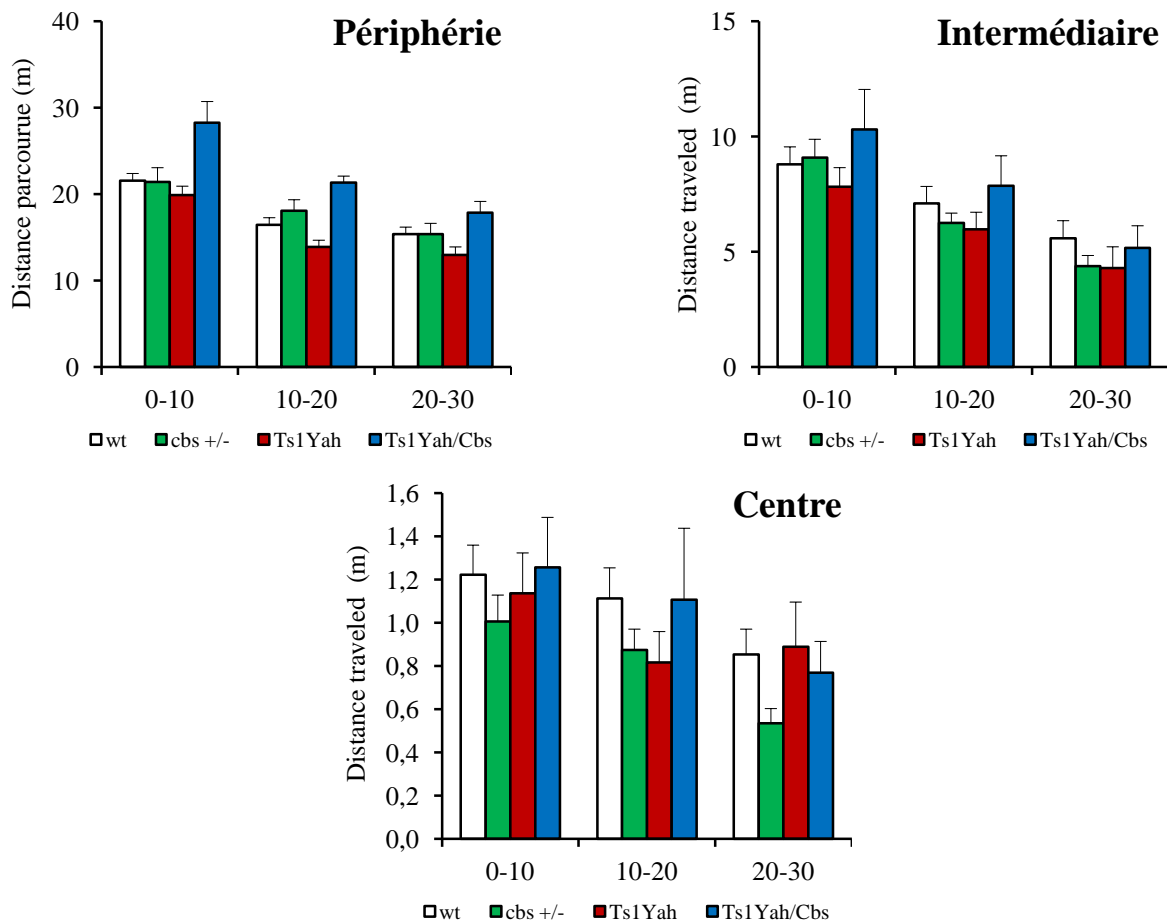


Figure 50 Représentations de la distance moyenne parcourue dans les différentes zones de l'arène (périphérique, intermédiaire et centrale), par intervalle de 10 minutes sur la totalité de la session (30 min).

4. Test de mémorisation en piscine de Morris version plateforme cachée

Ce test a été sélectionné afin de confirmer d'une part le caractère particulier des Ts1Yah, qui apprennent plus rapidement que des souris wt en test de piscine de Morris (Lopes Pereira et al., 2009), et d'autre part étudié avec attention la phase d'apprentissages des Ts1Yah/Cbs qui pourraient présenter une toute autre attitude. Durant cette tâche, les souris ont toutes appris de la même manière, indépendamment du génotype (Figure 51) ; il n'existe donc pas de différence entre les génotypes (Distance parcourue : Test ANOVA avec mesures répétées, variable « génotype » et « jour », $F(3;196)=0,219$ $p=0,883$). D'autre part, la distance parcourue est significativement plus réduite au dernier jour (J5) par rapport à J1 et ce pour les 4 génotypes étudiés (Distance parcourue : Test ANOVA avec mesures répétées, variable « jour » et « génotype », $F(4;196)=54,394$ $p<0,001$; post hoc wt « J1 vs J5»: $q=8,674$ $p<0,001$; Cbs +/- « J1 vs J5»: $q=11,618$ $p<0,001$; Ts1Yah « J1 vs J5»: $q=7,680$ $p<0,001$; Ts1Yah/Cbs

« J1 vs J5»: $q=8,785$ $p<0,001$). Le premier constat se porte sur les souris Ts1Yah/Cbs qui n'ont pas de défaut d'apprentissage, le phénotype des Ts1Yah serait donc restauré par la diminution d'une copie du gène *Cbs*. De plus, aucune souris ne présente de défaut visuel puisque toutes réussissent la tâche après un parcours aussi rapide qu'au dernier jour d'apprentissage lors de la session « cued » avec une plateforme indiquée par un indice visuel.

Le probe test est également réussi par tous les groupes qui passent significativement plus de temps dans le quadrant cible (NE) (Figure 52). (Pourcentage de temps passé dans le quadrant : Test ANOVA, variable « quadrant » et « génotype », $F(1;204)=54,943$ $p<0,001$; post hoc Student Newman Keuls : wt « TQ vs NTQ»: $q=6,320$ $p<0,001$; Cbs +/- « TQ vs NTQ»: $q=6,788$ $p<0,001$; Ts1Yah « TQ vs NTQ»: $q=4,840$ $p<0,001$; Ts1Yah/Cbs « TQ vs NTQ»: $q=3,140$ $p=0,026$)

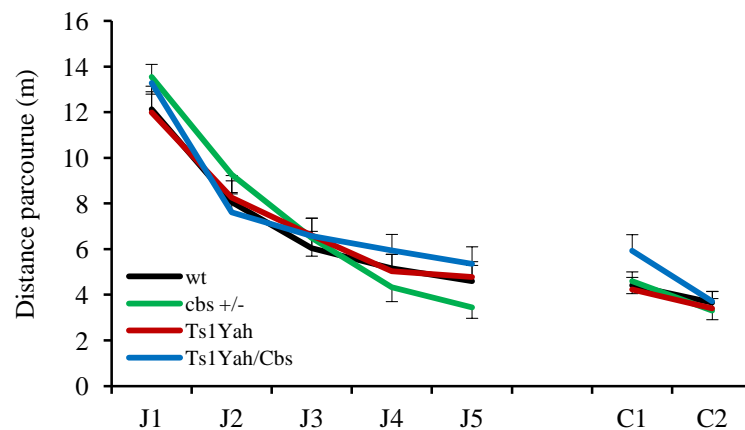


Figure 51 Courbes d'apprentissage de la cohorte Ts1Yah x Cbs +/- au cours du test version plateforme cachée de la piscine de Morris. Cette expérience se déroule en une phase d'apprentissage de 5 jours où est évaluée la capacité de mémorisation spatiale des souris, puis une phase de test « cued » où les souris se dirigent grâce à un repère visuel placé sur la plateforme afin de déterminer les performances visuelles (souris âgées de 12 semaines – fond C57BL/6N ; valeurs moyennes \pm SEM).

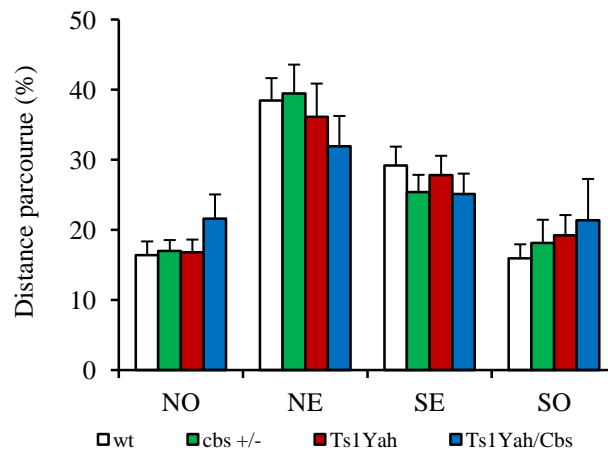


Figure 52 Représentation graphique du second probe test à travers la mesure du temps passé par quadrant (en pourcentage). Ce test est réalisé à J6.

Néanmoins, durant cette expérience, en suivant le même protocole que celui établi dans l'article de Lopes Pereira, le phénotype connu des Ts1Yah n'a pas été retrouvé. Malgré les bonnes performances des 4 groupes, aucune conclusion n'est établie du fait de l'absence du profil d'apprentissage accéléré des souris Ts1Yah.

5. Le labyrinthe en Y

De la même manière que le choix du test de piscine de Morris, la sélection du labyrinthe suit une logique identique puisque les Ts1Yah sont connues pour exprimer un déficit d'alternance spontanée dans les bras, traduisant un défaut de la mémoire de travail. Les souris sont soumises à un choix de 3 bras qu'elles doivent parcourir durant 5 minutes. L'alternance spontanée est mesurée par le nombre de fois où l'animal visite consécutivement 3 bras différents, ramenée à un pourcentage du nombre total de bras visités. Dans cette tâche, l'hyperactivité des souris Ts1Yah/Cbs est de nouveau observée à travers le nombre de bras totaux visités durant la session (Figure 53) (Test t de student wt vs Ts1Yah/Cbs $p=0,002$; Cbs +/- vs Ts1Yah/Cbs $p=0,006$; Ts1Yah vs Ts1Yah/Cbs $p=0,007$).

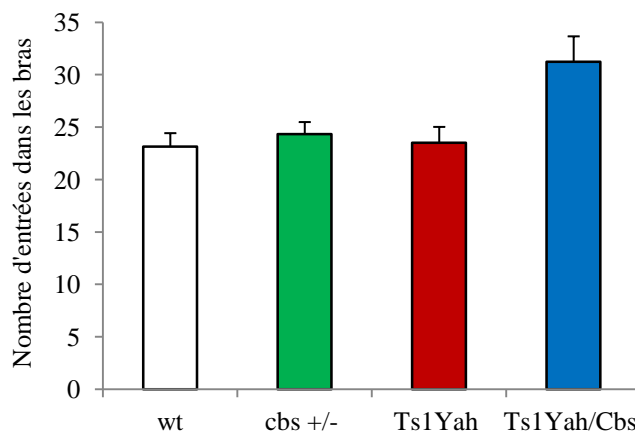


Figure 53 Représentation graphique du nombre total de bras visités par les 4 groupes génotypiques durant la session de 8 minutes dans le labyrinthe en Y (souris âgées de 16 semaines – fond C57BL/6J ; valeurs moyennes \pm SEM)

Durant ce test, l'estimation de l'alternance spontanée traduit la capacité de la mémoire de travail de chaque souris (Figure 54). Il apparaît que les souris wt, Cbs +/- et Ts1Yah/Cbs explorent de manière similaire les bras du labyrinthe, alors que les souris Ts1Yah performent mieux que les souris contrôles (Test t de student wt vs Ts1Yah p=0,011).

Dans la littérature, ces souris présentent également un défaut d'alternance spontanée mais négativement. Comme pour le test en MWM, les souris Ts1Yah sur fond C57BL/6NTac présentent des phénotypes sensiblement différents du modèle sur B6J. Le contexte génétique influe donc sur les fonctions cognitives ; cela pourrait modéliser la variabilité génétique chez l'humain et les différences de pénétrance du retard mental chez les patients Down syndrome.

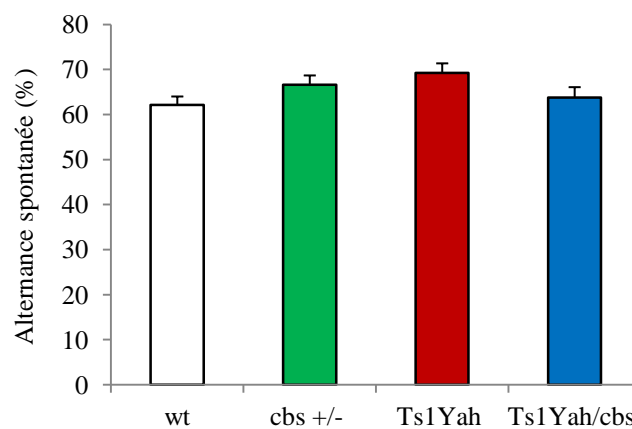


Figure 54 Représentation graphique de l'alternance spontanée calculée pour les 4 groupes génétiques durant la session de 8 minutes dans le labyrinthe en Y.

6. Le rotarod

Ce test évalue la coordination motrice de la cohorte. La vitesse de chute ainsi que le temps de latence avant la chute ont été mesurés ; après l'étude du temps et de la vitesse de chute, il apparaît qu'aucun groupe ne présente de trouble de coordination puisqu'il n'existe pas d'intervalle de performance au 1^{er} jour d'entraînement ; (Latence : Test ANOVA avec mesures répétées, variable « génotype » et « jour », $F(3;110)=1,027$ $p=0,388$ / Vitesse : Test ANOVA avec mesures répétées, variable « jour » et « génotype », $F(3;110)=1,816$ $p=0,155$). De plus, les 4 groupes apprennent la tâche imposée et améliorent leur performance au cours de l'entraînement (Latence : Test ANOVA avec mesures répétées, variable « jour » et « génotype », $F(2;110)=28,459$ $p<0,001$ post hoc méthode Tuckey wt « J1 vs J3 » $q=6,119$ $p<0,001$; Cbs +/- « J1 vs J3 » $q=6,430$ $p<0,001$; Ts1Yah « J1 vs J3 » $q=5,166$ $p=0,001$;

Ts1Yah/Cbs « J1 vs J3 » $q=4,293$ $p=0,008$ / Vitesse : Test ANOVA avec mesures répétées, variable « jour » et « génotype », $F(2;110)=49,362$ $p<0,001$ post hoc méthode Tuckey wt « J1 vs J3 » $q=9,696$ $p<0,001$; Cbs +/- « J1 vs J3 » $q=8,566$ $p<0,001$; Ts1Yah « J1 vs J3 » $q=3,659$ $p=0,029$; Ts1Yah/Cbs « J1 vs J3 » $q=6,208$ $p<0,001$).

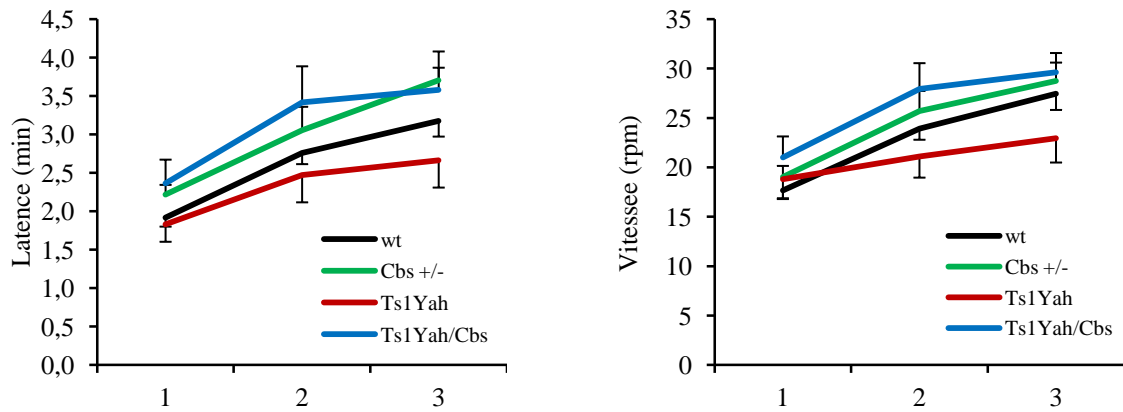


Figure 55 Représentation graphique des performances locomotrices, à travers l'évaluation de la latence de chute (graphe de gauche) et de la vitesse à laquelle a lieu la chute (graphe de droite), des 4 groupes composant la cohorte (souris âgées de 15 semaines – fond C57BL/6N ; valeurs moyennes \pm SEM).

Au cours la phase de test, aucun génotype n'a de profil différent du groupe sauvage (Figure 56); par ailleurs, les souris Ts1Yah présentent quand même un niveau de performance plus faible que les souris Cbs +/- et Ts1Yah/Cbs (Test ANOVA, variable « vitesse » et « génotype » $F(3 ; 385)=5,544$ $p<0,001$; post hoc méthode Tuckey « wt vs Ts1Yah » $q=3,244$ $p=0,099$; « Cbs +/- vs Ts1Yah/Cbs » $q=5,301$ $p=0,001$; « Ts1Yah vs Ts1Yah/Cbs » $q=4,395$ $p=0,01$).

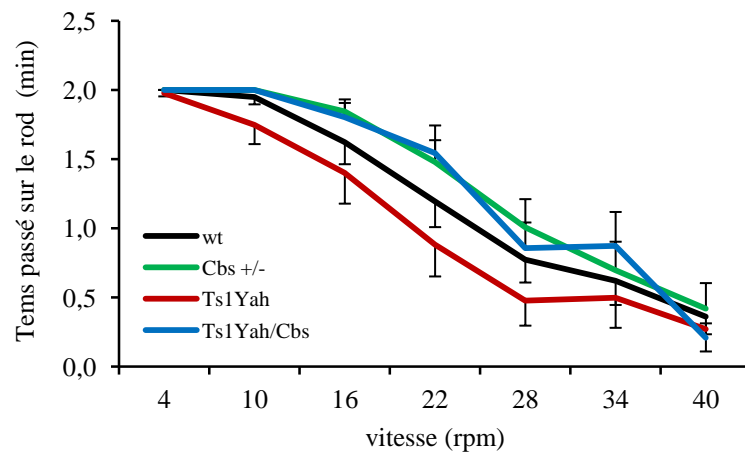


Figure 56 Représentation graphique des performances locomotrices, à travers l'évaluation de la latence de chute (graphe de gauche) et de la vitesse à laquelle a lieu la chute (graphe de droite), des 4 groupes composant la cohorte (valeurs moyennes \pm SEM).

7. Le test de reconnaissance d'objets

La publication du dr Pereira décrivait l'altération de la mémoire visuelle à court terme des Ts1Yah, après une heure de rétention entre la mise en contact avec l'objet familier et la mise en contact avec les deux objets, nouveau et familier. L'analyse de la cohorte sur fond B6NTac a été un échec dans l'étude de la mémorisation à court terme chez les souris Ts1Yah. En effet, selon le même protocole que la publication de référence, répétée deux fois, et avec 2 lots de 2 objets (4 objets différents au total), le groupe Ts1Yah ne présentait plus les défauts de mémorisation caractéristiques. Les conditions environnementales ne pouvant être changées, l'option choisie fut de redériver le fond génétique vers un fond pur C57BL/6J. Une nouvelle cohorte a donc été formée. L'expérience sur ce groupe d'animaux a donné les résultats suivants (Figure 57) :

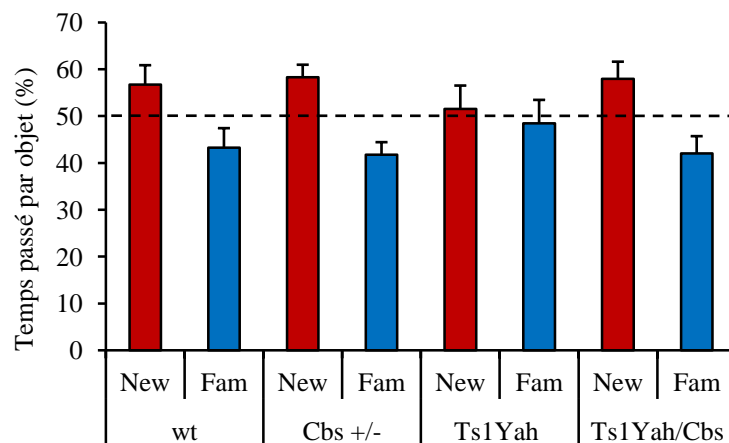


Figure 57 Représentation graphique du test de reconnaissance d'objets ; le temps passé sur l'objet nouveau (rouge) et le familier (bleu) sont évalués en pourcentage par rapport au temps global d'exploration (souris âgées de 12 semaines – fond C57BL/6J ; valeurs moyennes \pm SEM).

Les groupes wt, *Cbs* +/- et Ts1Yah/*Cbs* passent statistiquement plus de temps sur le nouvel objet que l'ancien (ANOVA) alors que les souris Ts1Yah ne les différencient pas et passent indifféremment autant de temps sur l'un que sur l'autre.

Le gène *Cbs* se révèle donc avoir une influence sur certaines performances de mémoire, en particulier dans la mémoire à court terme. Une action rapide sur la transmission de l'influx nerveux paraît être l'option la plus probable, au regard de l'activité neuronale connue dans l'hippocampe des Ts1Yah (Pereira et al., 2009). Pour enrichir l'hypothèse proposée, nous avons réalisé une étude complémentaire : au lieu de diminuer une dose de *Cbs* dans un contexte de trisomie partielle, nous avons augmenté cette dose dans un contexte sauvage. Tout phénotype recensé chez ces individus et comparable à ceux des souris Ts1Yah confirmerait le rôle de ce gène dans la symptomatologie de la trisomie 21.

C. Gène candidat *Cbs* : analyse comportementale de la cohorte *Tg(Gfp-Hcbs)95-157 x Tg(CamkII-cre)* Vérification de l'activation du transgène

1. Génotypage

La formation d'une cohorte équilibrée nécessite toujours l'identification du génotype des individus. Nous utiliserons ici 2 modèles d'animaux transgéniques. Le premier modèle nommé *Tg(CamkII-cre)* possède un transgène intégré de la CRE sous le contrôle du promoteur de la CamKinase II. La protéine CRE est donc seulement exprimée dans les tissus exprimant cette enzyme, à savoir l'hippocampe en grande majorité, et quelques autres noyaux cérébraux. Le génotypage des individus révèle une bande correspondant à une amplification du gène *Cre* d'environ 355pb (figure 58).

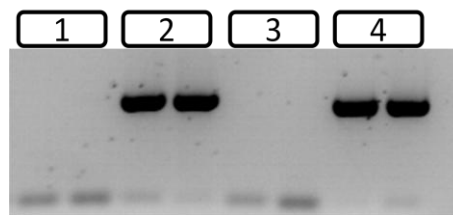


Figure 58 Photographie d'un gel d'agarose révélant le génotype des individus testés. Les primers utilisés révèlent 1 bande pour les individus CRE et aucune bande pour les sauvages. 4 génotypes ont été analysés

(1=wt ; 2=Tg(Hcbs) ; 3=Tg(Cre) ; 4=Tg(Hcbs)/Tg(Cre). Chaque chiffre représente l'ADN de 2 individus distincts du génotype concerné.

Le second génotype correspond aux individus dotés du transgène inducible Tg(*Gfp-Hcbs*)95-157. Ce transgène permet l'expression de la GFP dans un environnement cellulaire sauvage. Le transgène est identifié par une bande d'amplification à 320 pb (figure 50). Lorsque les animaux possèdent à la fois le transgène *Cre* et le transgène *Hcbs*, la cassette GFP va être excisée par l'activité enzymatique de la CRE et le transgène va se reformer pour permettre l'expression de la cassette suivante qui est la CBS humaine. Toute cette manipulation génétique doit être validée, et c'est ce que nous allons expliquer dans le chapitre suivant.

Avant mon arrivée dans le laboratoire, un premier screening de modèles murins possédant le transgène *Hcbs* a été réalisé afin de trouver une lignée contenant environ une copie de ce transgène insérée dans le génome; la quantité de protéine CBS potentiellement produite équivaldrait à la quantité produite par un génome tripliqué pour la CBS, soit les conditions du syndrome de Down. Le modèle n°157 a été choisi car, d'une part il montrait une expression du transgène restreinte au cerveau (cortex, hippocampe), et le dosage de la GFP par PCR quantitative atteignait une expression relative de 1,2 copie. Ces 2 conditions ont confirmé le choix de cette lignée pour l'étude de surexpression de *Cbs* dans le cerveau.

Comme décrit dans le chapitre correspondant dans le matériel et méthode, le but de ce croisement est d'exprimer un transgène humain de la CBS en lieu et place du transgène GFP, visuellement localisé dans le cerveau par fluorescence. Plusieurs étapes ont été nécessaires pour valider le croisement : vérifier l'intégrité du transgène après excision de la cassette GFP ; contrôler la séquence du transgène sur le site du loxP reconstitué afin de s'assurer que le cadre de lecture est respecté ; enfin l'expression du transgène dans différentes régions du cerveau a été examinée dans le but de confirmer la localisation de la surexpression de la CBS.

2. Remaniement génétique

Les présences du transgène *Gfp* (couple de primers a), du transgène *Hcbs* (b) et de la terminaison polyA (c) ont été détectées par PCR (Figure 59) à partir d'ADN génomique de chaque groupe (2 individus par génotype) afin d'observer, ou non, le remaniement au niveau des sites loxP. Les ADN wt et Tg(*Cre*) n'ont pas d'amplicons pour aucun des couples testés, hormis le couple contrôle de la myosine. Les ADN Tg(*Hcbs*) montrent une amplification du

transgène Hcbs, du poly A, et une bande à environ 1220 pb pour l'amplicon « Gfp » traduisant la présence de la cassette Gfp. Enfin, les animaux Tg(Hcbs)/Tg5Cre), expriment le même profil que les individus Tg(Hcbs) sauf pour le couple a, où l'amplicon résultant mesure environ 250 pb, taille correspondant à la taille du loxP.

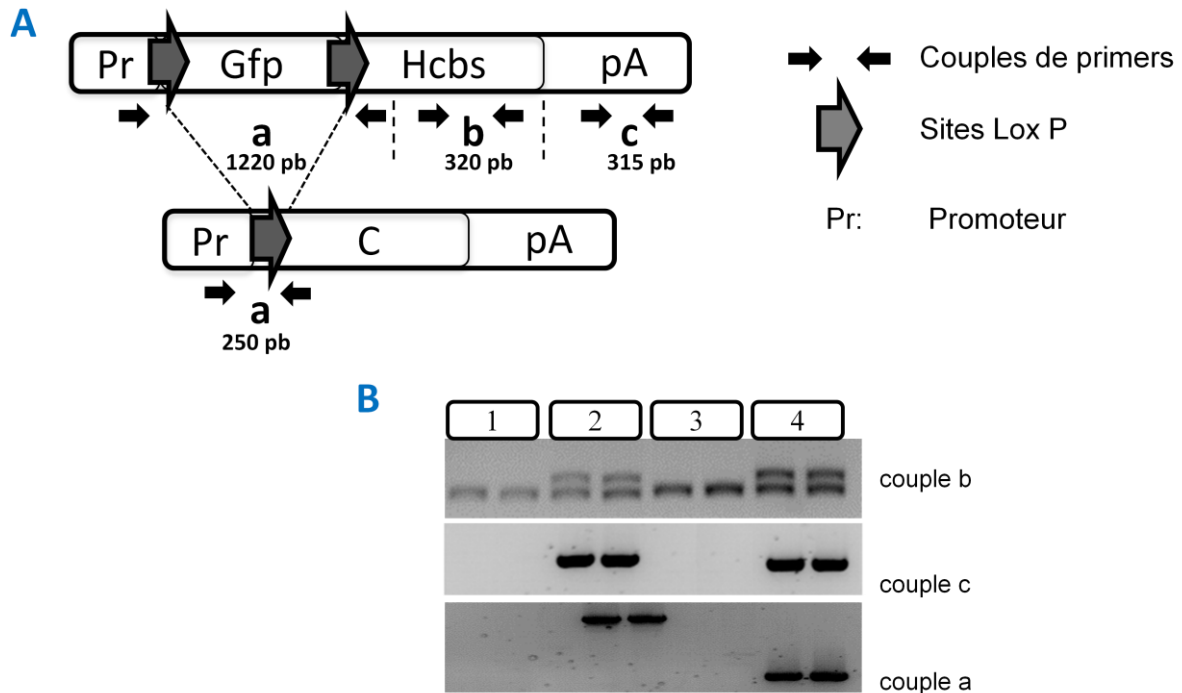


Figure 59 Validation du remaniement génétique dans les souris porteuses des transgènes Gfp-Hcbs et Cre. La Figure A représente la construction du transgène des souris Tg(Gfp-Hcbs)95-157 avant et après excision de la Gfp par la Cre. Sont également représentés les couples d'amorces utilisés pour l'amplification des séquences nécessaires au fonctionnement du transgène (a=couple encadrant les loxP ; b=couples amplifiant le transgène Hcbs comparé au gène contrôle de la myosine (250 pb) ; c=couple dédié à la séquence codante du polyA SV40). La Figure B présente les résultats de PCR après migration sur gel selon les 4 génotypes (1=wt ; 2=Tg(Hcbs) ; 3=Tg(Cre) ; 4=Tg(Hcbs)/Tg(Cre)). Chaque chiffre est représenté par 2 ADN distincts.

3. Séquençage du site d'excision de la cassette Gfp

L'amplicon résultant de la PCR par le couple « a » a été séquençé pour vérifier l'intégrité du transgène après remaniement, et la conservation du cadre de lecture pour obtenir un transcrite complet capable de donner naissance à une protéine humaine fonctionnelle chez la souris :

[GCATTCTGCCTTCTAGTGG]TACGGCGCGCCCGAATTGCCCGGGATAA**ACTTCGTATAGCATACATTATACGA**
AGTTATCGGATCGGGATCCACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCACCGGGGTGGTGC

CCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATG
 CCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTG
 ACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTC
 CGCCATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCC
 GAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGC
 AACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAG
 AACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACC
 AGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCT
 GAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTC
 GGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGA**CTGTGCCTTCTAGTTGCC**
AGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAGTGCCTTTCCTAAT
AAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAG
CAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGA
 AAGAACCAGGATCCG**ATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTAT**ACTAGAGCGGCCTCCCCGGGACG
AATTCGCACCATCTGTCCGGTCCCAGCATGCCTTCTGAGACCCCCAGGCAGAAGTGGGGCCACAGGCTGCC
CCCACCGCTCAGGGCCACACTCGGCGAAGGGGAGCCTGGAGAAGGGTCCCCAGA[GGATAAGGAAGCCAAGGA
 GC]

Légende:

ATGC]=séquences reconnues par les primers “a”
ATGC=séquence GFP
ATGC=séquence du polyA utilisé par le transcrit de la GFP
ATGC=séquences des LoxP
ATGC=séquence de l’ADNc de la CBS humaine

ATGC= les séquences surlignées représentent le résultat du séquençage : celles marquées sur les séquences des LoxP sont identiques, cela signifie que les 2 loxP se sont divisés pour l’excision puis la CRE a reformé un LoxP unique.

4. Expression du transgène Hcbs après excision

Suite à l’excision du transgène *Gfp*, le promoteur de la construction tient maintenant sous son contrôle l’ADN complémentaire de la CBS humaine. L’expression relative de ce transgène a été mesurée par PCR quantitative dans 3 centres nerveux du cerveau : le cortex, l’hippocampe (tous deux fluorescents dans le cerveau des individus Tg(Gfp-Hcbs)) et le cervelet en tant que contrôle négatif.

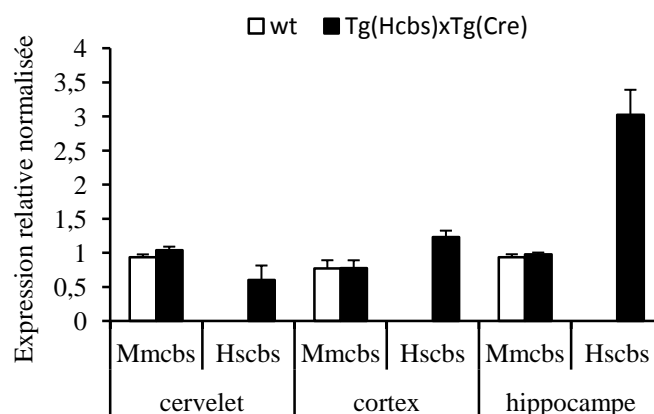


Figure 60 Expression relative des gènes de la CBS murine (*Mmcbs*) et du transgène humain (*Hscbs*) dans le cervelet, cortex et hippocampe des souris sauvages comparée aux souris doubles transgéniques.

Tous ces résultats montrent en premier lieu que le remaniement génétique s'est fait avec réussite et efficacité dans les individus doubles transgéniques. Ensuite, la CBS humaine est effectivement exprimée dans l'hippocampe, à hauteur de quasi 3 copies, auxquelles s'ajoute la copie sauvage par les 2 allèles du génome. Les conditions « trisomie 21 » ne sont plus respectées, néanmoins, ce modèle permet d'étudier les effets de la surexpression de CBS dans le cerveau, et d'observer de potentiels phénotypes cognitifs. Enfin, l'expression du transgène fuite malheureusement dans d'autres régions du cerveau, à savoir le cortex et le cervelet dans des proportions non négligeables. Même si l'hippocampe représente le noyau le plus propice aux effets de la CBS, la surexpression dans ces régions secondaires pourrait elle aussi faire apparaître d'autres phénotypes, communs ou non au SD.

5. Variation de poids

Le poids des animaux a été mesuré avant le premier test, à la fin de tous les tests, et un mois après le dernier test. La dernière prise de poids (Figure 61) montre que les souris Tg(Hcbs) ont un poids moyen statistiquement plus élevé que les 3 autres groupes (test t de student wt vs Tg-Hcbs $p=0,006$; Tg(Cre) vs Tg(Hcbs) $p=0,034$; Tg(Hcbs)/Tg(Cre) vs Tg(Hcbs) $p<0,001$). Il semblerait donc que la position de l'insertion du transgène CRE agisse sur des promoteurs en cis qui régulent des gènes du métabolisme ou de l'appétit. Néanmoins, ces effets ne contre indiquent pas les tests de cognition effectués.

| Génotype | Poids moyen (g) | S.E.M. |
|----------|-----------------|--------|
| wt | 31 | 0,11 |
| Tg(Hcbs) | 33 | 0,16 |
| Tg(Cre) | 31,3 | 0,16 |

| | | |
|------------------|------|------|
| Tg(Hcbs)/Tg(Cre) | 29,3 | 0,17 |
|------------------|------|------|

Figure 61 Tableau récapitulatif de la valeur du poids moyen des souris, hors de la période de test comportemental. (âge environ 6 mois \pm 1 semaine)

Un deuxième groupe diffère également des autres, celui surexprimant la CBS humaine (Tg(Hcbs)/Tg(Cre)). Ces souris ont toute un poids moyen inférieur aux autres (test t de student wt vs Tg(Hcbs)/Tg(Cre) $p=0,032$; Tg(Cre) vs Tg(Hcbs)/Tg(Cre) $p=0,025$); comme pour les souris Cbs +/-, il semblerait ici qu'une trop forte quantité de la protéine induise les mêmes changements métaboliques qu'une faible quantité. Il s'y ajoute que la surexpression étant restreinte au cerveau, la CBS agisse soit sur des centres de régulation de l'appétit, soit diffuse dans le sang via le LCR pour agir sous une fonction exocrine sur des cellules du foie par exemple, et modifie l'utilisation des stockages d'énergie.

6. Analyse comportementale de la cohorte Tg(Gfp-Hcbs)95-157 x Tg(CamkII-cre)

a) Test en champ ouvert

Ce test est réalisé dans les mêmes conditions que les cohortes précédentes. Il apparait que seul le groupe Tg(Cre) diffère des autres ; les souris de ce groupe ont, comme pour les Ts1Yah/Cbs, un phénomène d'hyperactivité qui se manifeste (Test t de student wt vs Tg(Cre) $p=0,002$; Tg(Hcbs) vs Tg(Cre) $p=0,002$). Comme pour l'expérience de l'autre cohorte (Ts1Yah x Cbs+/-), le comportement anxigène n'est pas affecté et le surplus de distance parcourue apparait surtout dans la zone périphérique. (figure 62)

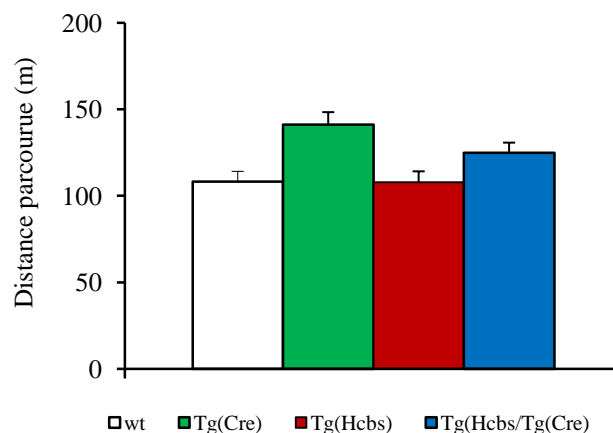


Figure 62 Représentation graphique de la distance parcourue dans l'arène durant la session « open field » de 30 minutes.

b) Le labyrinthe en Y

Toujours dans l'optique d'une comparaison des cohortes Ts1Yah x Cbs+/- et Tg(Hcbs) x Tg(Cre), l'étude de la mémoire de travail à court terme a évidemment été réalisée sur cette cohorte. En premier lieu a été observé l'hyperactivité, qui se traduit dans ce test par un nombre de bras visités élevés par rapport à l'ensemble des groupes (Test t de student wt vs Tg(Cre) $p=0,035$ et Tg(Hcbs) vs Tg(Cre) $p=0,001$) (Figure 63).

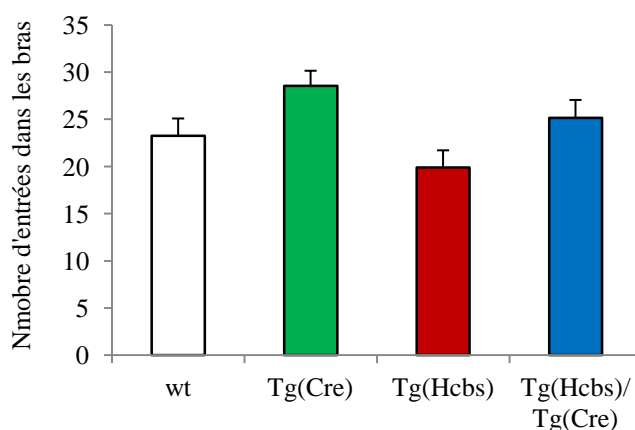


Figure 63 Représentation graphique du nombre total d'entrées dans les bras du labyrinthe.

Au niveau de l'alternance spontanée, il n'y a aucune différence entre les groupes (test t de student). Le gène *Cbs* surexprimé ne suffit pas à lui seul à altérer la mémoire de travail des souris.

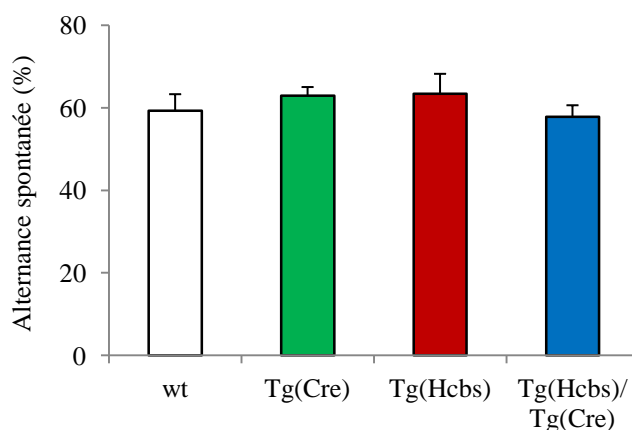


Figure 64 Représentation graphique de l'alternance spontanée dans les 3 bras du labyrinthe.

Contrairement à la méthode de diminution de dose de *Cbs* dans un contexte trisomique, la surexpression seule de cette protéine ne suffit pas à déstabiliser le fonctionnement de la mémoire de travail. Cette mémoire étant une mémoire à très court terme, elle ne nécessite pas

un enregistrement permanent de l'information et donc utilise peu l'hippocampe. La CBS n'a donc pas d'effet sur le stockage de la mémoire de travail via l'hippocampe.

c) Le rotarod

Par un souci de comparaison totale avec le groupe Ts1Yah/Cbs, l'investigation des capacités locomotrices a été ajoutée à la batterie de tests comportementaux. Cette épreuve a permis de mettre en évidence que tous les groupes performant de la même manière au premier jour du test, traduisant la bonne aptitude locomotrice de l'ensemble des animaux (Latence : Test ANOVA avec mesures répétées, variable « génotype » et « jour », $F(3;90)=2,207$ $p=0,10$ / Vitesse : Test ANOVA avec mesures répétées, variable « jour » et « génotype », $F(3;90)=2,011$ $p=0,126$). Néanmoins, même si ces souris n'ont pas de défaut de coordination motrice, les Tg(Hcbs) sont le seul groupe à ne pas accroître leur performance entre le 1^{er} et le 3^e jour (Latence : Test ANOVA avec mesures répétées, variable « jour » et « génotype », $F(2;90)=38,200$ $p<0,001$ post hoc méthode Tuckey wt « J1 vs J3 » $q=4,071$ $p=0,014$; Tg(Cre) J1 vs J3 » $q=10,965$ $p<0,001$; Tg(hcbs) « J1 vs J3 » $q=2,10$ $p=0,303$; Tg(Hcbs)/tg(Cre) « J1 vs J3 » $q=6,990$ $p<0,001$ / Vitesse : Test ANOVA avec mesures répétées, variable « jour » et « génotype », $F(2;90)=44,783$ $p<0,001$ post hoc méthode Tuckey wt « J1 vs J3 » $q=5,230$ $p<0,001$; Tg(Cre) J1 vs J3 » $q=11,120$ $p<0,001$; Tg(hcbs) « J1 vs J3 » $q=2,466$ $p=0,195$; Tg(Hcbs)/tg(Cre) « J1 vs J3 » $q=6,418$ $p=0,008$).

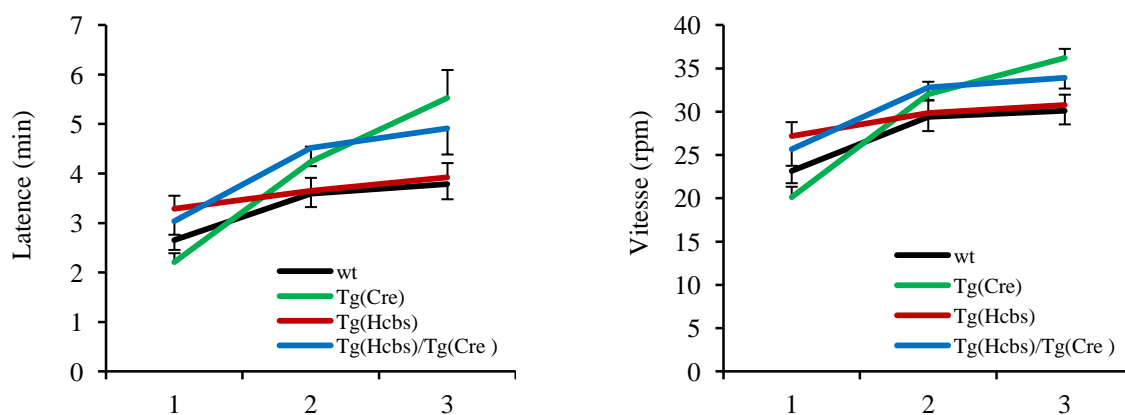
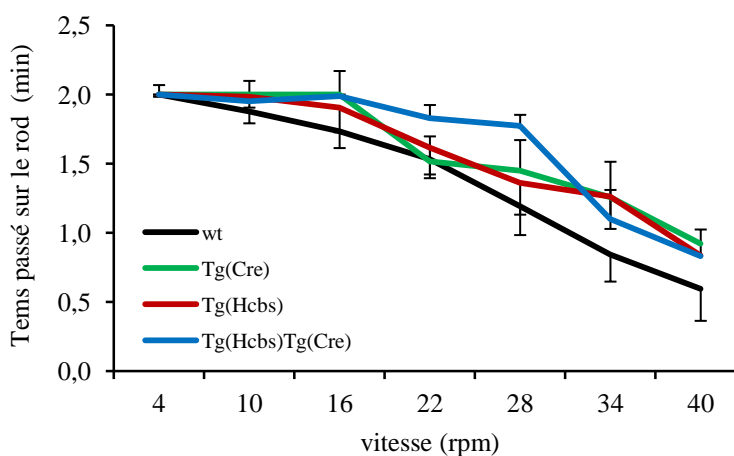


Figure 65 Représentation graphique des performances locomotrices, à travers l'évaluation de la latence de chute (graphe de gauche) et de la vitesse à laquelle a lieu la chute (graphe de droite), des 4 groupes composant la cohorte (valeurs moyennes \pm SEM).

Au niveau du test en vitesse constante, toutes les souris performant de la même manière, excepté le groupe T(Hcbs)/Tg(Cre) qui restent statistiquement plus longtemps sur la barre tournante que les souris sauvages (Test ANOVA « vitesse » et « génotype » $F(3;322)=3,931$

$p=0,009$; wt vs Tg(Hcbs)/Tg(Cre) $q=4,6$ $p=0,006$). Ce résultat est cependant relatif, puisqu'il a été montré que ces souris doubles transgéniques étaient moins lourdes que les souris sauvages, il est donc normal qu'à capacités égales, les souris les plus légères se maintiennent plus longtemps sur l'axe.



. Figure 66 Représentation graphique des performances locomotrices, à travers l'évaluation de la latence de chute (graphe de gauche) et de la vitesse à laquelle a lieu la chute (graphe de droite), des 4 groupes composant la cohorte (valeurs moyennes \pm SEM).

Globalement, les 4 groupes de souris performant de la même manière sur l'ensemble du test et donc la CBS n'agit pas sur les fonctions locomotrices de ces animaux. L'hippocampe, n'intervient pas dans la genèse des mouvements ; le cervelet cependant en est un moteur essentiel : l'expression faible de la CBS humaine dans cet organe ne nuit pas à la transmission de l'influx nerveux entre le cervelet et les terminaisons nerveuses issues de la moëlle épinière.

d) *Le test de reconnaissance d'objets*

Ce test est le point essentiel de notre analyse sur ce projet. La diminution d'une copie de *Cbs* a montré une restauration phénotypique de mémorisation visuelle. Le but de cette dernière épreuve est de se placer dans les conditions d'une surexpression de *Cbs*, comme dans la trisomie 21, mais dans un contexte génétique entièrement sauvage. Tout changement dans la mémorisation des objets serait dû exclusivement à la présence en quantité non physiologique de la CBS. Les résultats sont représentés ci-dessous (figure 67).

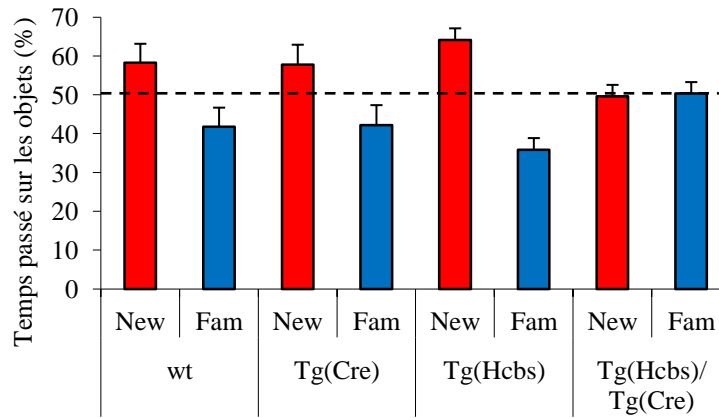


Figure 67 Représentation graphique du test de reconnaissance d'objets ; le temps passé sur l'objet nouveau (rouge) et le familier (bleu) sont évalués en pourcentage par rapport au temps total d'exploration. Le graphique est basé sur les moyennes par groupe \pm SEM.

Les groupes wt et Tg(Cre) différencient significativement les 2 objets (Test t de student : wt « New vs Fam » $p=0,023$; Tg(Cre) « New vs Fam » $p=0,001$) tandis que les doubles transgéniques Tg(Hcbs)/Tg(Cre) passent autant de temps sur l'un que sur l'autre (Tg(Hcbs)/Tg(Cre) « New vs Fam » $p=0,86$).

Remarque : sur les 12 animaux Tg(Hcbs), seulement 6 ont validé la première étape du protocole à savoir une exploration supérieure à 3 secondes avec l'objet familier seul. Un nouveau lot de souris Tg(Hcbs) a donc été formé afin de confirmer la (in)capacité à mémoriser à court terme un objet. Les résultats ont été additionnés en lieu et place de ceux du groupe précédent dans la figure 67,, confirmant le bon fonctionnement de la mémoire de ces animaux (Test t de student : wt « New vs Fam » $p=0,002$; Tg(Hcbs) « New vs Fam » $p<0,001$).

Il est donc possible de conclure que la surexpression de la CBS humain dans un modèle murin conduit à une altération de la mémoire à court terme ; ces résultats forment les premiers fondements de réponse à l'hypothèse qui propose le gène de la CBS comme candidat possible aux phénotypes cognitifs du modèle de trisomie partielle Ts1 Yah.

ANNEXES RESULTATS

| Gp | ID sonde | Nom du gène | Chr | wt moy±sem | Ts1Yah moy±sem | Fold Change | Test post hoc |
|----|--------------|----------------------|-----|---------------|-------------------|----------------|------------------|
| 1 | 1440413_at | <i>Vwc2l</i> | 1 | 1,86±0,34 | 1,26±0,27 | 0,68 | ** |
| 1 | 1425483_at | <i>Tox</i> | 4 | 1,41±0,21 | 1,04±0,22 | 0,74 | * |
| 1 | 1422160_at | <i>H2-T24</i> | 17 | 0,87±0,08 | 0,64±0,05 | 0,74 | ** |
| 1 | 1455719_at | <i>Tubb5</i> | 17 | 0,99±0,02 | 0,74±0,05 | 0,74 | ** |
| 1 | 1439525_at | <i>1700066D14Rik</i> | UN | 0,94±0,06 | 0,71±0,06 | 0,76 | * |
| 1 | 1422877_at | <i>Pcdhb12</i> | 18 | 0,9±0,04 | 0,69±0,04 | 0,77 | ** |
| 1 | 1451751_at | <i>Ddit4l</i> | 3 | 1,08±0,19 | 0,84±0,12 | 0,78 | * |
| 1 | 1423760_at | <i>Cd44</i> | 2 | 1,25±0,2 | 0,98±0,15 | 0,78 | * |
| 1 | 1449875_s_at | <i>LOC100044190</i> | UN | 1,1±0,07 | 0,86±0,07 | 0,78 | * |
| 1 | 1450750_a_at | <i>Nr4a2</i> | 2 | 0,9±0,1 | 0,71±0,15 | 0,79 | * |
| 1 | 1450712_at | <i>Kcnj9</i> | 1 | 1,09±0,13 | 0,86±0,13 | 0,79 | * |
| 1 | 1416132_at | <i>Efr3a</i> | 15 | 0,94±0,1 | 0,74±0,11 | 0,79 | * |
| 1 | 1440564_at | <i>Prokr2</i> | 2 | 0,91±0,13 | 0,73±0,11 | 0,80 | ** |
| 1 | 1437595_at | <i>E030010A14Rik</i> | 19 | 0,95±0,05 | 0,76±0,06 | 0,80 | * |
| 1 | 1427782_a_at | <i>Crhr1</i> | 11 | 0,95±0,05 | 0,76±0,09 | 0,80 | * |
| 2 | 1446815_at | <i>Immp1l</i> | 2 | 0,92±0,06 | 1,09±0,1 | 1,20 | * |
| 2 | 1441977_at | <i>9630023C09Rik</i> | UN | 0,91±0,04 | 1,09±0,09 | 1,20 | * |
| 2 | 1443426_at | <i>Sltm</i> | 9 | 0,99±0,09 | 1,18±0,06 | 1,20 | * |
| 2 | 1447951_at | <i>5730403B10Rik</i> | 16 | 0,88±0,07 | 1,05±0,08 | 1,20 | ** |
| 2 | 1458508_at | <i>Matr3</i> | 18 | 0,98±0,06 | 1,18±0,04 | 1,20 | ** |
| 2 | 1442213_at | <i>LOC552908</i> | UN | 0,95±0,04 | 1,14±0,05 | 1,20 | ** |
| 2 | 1432807_at | <i>5830426K05Rik</i> | UN | 1,06±0,06 | 1,27±0,08 | 1,20 | * |
| 2 | 1457651_x_at | <i>Rem2</i> | 14 | 0,9±0,06 | 1,08±0,1 | 1,20 | * |
| 2 | 1459143_at | <i>Chchd3</i> | 6 | 1,12±0,08 | 1,34±0,07 | 1,20 | * |
| 2 | 1444343_at | <i>A130064L14Rik</i> | UN | 0,93±0,12 | 1,12±0,13 | 1,20 | * |
| 2 | 1420974_at | <i>Mdp1</i> | 14 | 0,96±0,05 | 1,16±0,1 | 1,20 | * |
| 2 | 1445400_at | <i>Hbxip</i> | 3 | 1±0,08 | 1,21±0,13 | 1,20 | * |
| 2 | 1431391_at | <i>Ralgps1</i> | 2 | 0,86±0,06 | 1,03±0,09 | 1,20 | * |
| 2 | 1458053_at | <i>Abi2</i> | 1 | 0,97±0,08 | 1,17±0,03 | 1,20 | * |
| 2 | 1420171_s_at | <i>Myh9</i> | 15 | 0,94±0,05 | 1,14±0,08 | 1,20 | ** |
| 2 | 1436981_a_at | <i>Ywhaz</i> | 15 | 1,02±0,11 | 1,23±0,17 | 1,20 | * |
| 2 | 1437671_x_at | <i>Prss23</i> | 7 | 0,98±0,08 | 1,18±0,18 | 1,20 | * |
| 2 | 1442632_at | <i>Agap1</i> | 1 | 0,93±0,06 | 1,12±0,07 | 1,21 | * |
| 2 | 1433300_at | <i>2900005I04Rik</i> | UN | 0,98±0,06 | 1,19±0,11 | 1,21 | * |
| 2 | 1441131_at | <i>Gm5295</i> | UN | 0,89±0,08 | 1,07±0,11 | 1,21 | ** |
| 2 | 1445440_at | <i>Ccdc88a</i> | 11 | 0,91±0,04 | 1,1±0,05 | 1,21 | ** |
| 2 | 1430415_at | <i>Phf6</i> | X | 0,98±0,05 | 1,19±0,09 | 1,21 | * |
| 2 | 1440819_s_at | <i>Szt2</i> | 4 | 0,94±0,04 | 1,13±0,1 | 1,21 | * |
| 2 | 1440854_at | <i>2810403A07Rik</i> | 3 | 1,07±0,09 | 1,3±0,07 | 1,21 | * |
| 2 | 1439518_at | <i>Mmrn2</i> | 14 | 1,03±0,12 | 1,24±0,12 | 1,21 | * |
| 2 | 1447263_at | <i>Metap2</i> | 10 | 1,05±0,07 | 1,27±0,13 | 1,21 | * |
| 2 | 1459791_at | <i>Dnajc1</i> | 2 | 0,9±0,08 | 1,08±0,15 | 1,21 | * |
| 2 | 1420098_s_at | <i>D13ErtD787e</i> | 13 | 0,95±0,06 | 1,15±0,06 | 1,21 | * |
| 2 | 1435952_at | <i>Tsc22d1</i> | 14 | 1±0,03 | 1,21±0,08 | 1,21 | * |
| 2 | 1457801_at | <i>9930024M15Rik</i> | UN | 1,03±0,07 | 1,25±0,11 | 1,21 | * |
| 2 | 1444430_at | <i>Armc8</i> | 9 | 0,91±0,04 | 1,11±0,08 | 1,21 | * |

| | | | | | | | |
|---|------------|----------------------|----|-----------|-----------|------|----|
| 2 | 1440020_at | <i>Rlf</i> | 4 | 0,93±0,04 | 1,13±0,1 | 1,21 | * |
| 2 | 1443586_at | <i>Fip1l1</i> | 5 | 1,13±0,07 | 1,37±0,09 | 1,21 | ** |
| 2 | 1458230_at | <i>Gria4</i> | 9 | 1,19±0,13 | 1,44±0,21 | 1,21 | * |
| 2 | 1458156_at | <i>E230012J19Rik</i> | UN | 0,87±0,08 | 1,05±0,05 | 1,21 | ** |
| 2 | 1443214_at | <i>Gpr155</i> | 2 | 0,9±0,07 | 1,09±0,12 | 1,21 | * |
| 2 | 1455831_at | <i>Fus</i> | 7 | 0,9±0,07 | 1,09±0,12 | 1,21 | * |
| 2 | 1446433_at | <i>Acbd5</i> | 2 | 0,97±0,05 | 1,18±0,14 | 1,21 | * |
| 2 | 1444237_at | <i>LOC100045758</i> | UN | 0,94±0,06 | 1,14±0,05 | 1,21 | * |
| 2 | 1447156_at | <i>Chm</i> | X | 0,97±0,06 | 1,18±0,07 | 1,21 | ** |
| 2 | 1443355_at | <i>Kansl1</i> | 11 | 1,06±0,1 | 1,29±0,11 | 1,22 | ** |
| 2 | 1440314_at | <i>Trip12</i> | 1 | 0,97±0,04 | 1,19±0,04 | 1,22 | ** |
| 2 | 1433258_at | <i>A330102K18Rik</i> | UN | 0,84±0,08 | 1,03±0,14 | 1,22 | * |
| 2 | 1443114_at | <i>A730059M13Rik</i> | UN | 0,94±0,09 | 1,14±0,07 | 1,22 | * |
| 2 | 1430593_at | <i>Ccdc30</i> | 4 | 0,98±0,02 | 1,19±0,14 | 1,22 | * |
| 2 | 1432910_at | <i>Btbd7</i> | 12 | 0,92±0,06 | 1,13±0,08 | 1,22 | ** |
| 2 | 1430151_at | <i>Nisch</i> | 14 | 0,9±0,06 | 1,1±0,05 | 1,22 | * |
| 2 | 1445137_at | <i>Ptk2</i> | 15 | 0,86±0,09 | 1,04±0,08 | 1,22 | * |
| 2 | 1456706_at | <i>4833441D16Rik</i> | UN | 0,99±0,04 | 1,21±0,07 | 1,22 | ** |
| 2 | 1456216_at | <i>Csnk1a1</i> | 18 | 0,91±0,05 | 1,11±0,05 | 1,22 | * |
| 2 | 1441617_at | <i>Med15</i> | 16 | 0,92±0,05 | 1,12±0,07 | 1,22 | ** |
| 2 | 1449755_at | <i>D7Ertd183e</i> | 7 | 0,93±0,05 | 1,14±0,11 | 1,22 | * |
| 2 | 1446303_at | <i>Igf1r</i> | 7 | 1,52±0,24 | 1,86±0,19 | 1,22 | * |
| 2 | 1457445_at | <i>Trps1</i> | 15 | 0,72±0,14 | 0,89±0,08 | 1,22 | * |
| 2 | 1457357_at | <i>Tlk2</i> | 11 | 0,91±0,07 | 1,12±0,09 | 1,22 | * |
| 2 | 1432133_at | <i>Ola1</i> | 2 | 0,96±0,03 | 1,17±0,07 | 1,22 | ** |
| 2 | 1458617_at | <i>Zmynd8</i> | 2 | 0,99±0,08 | 1,21±0,15 | 1,22 | * |
| 2 | 1440675_at | <i>Grif1</i> | 7 | 0,9±0,07 | 1,1±0,09 | 1,22 | * |
| 2 | 1431173_at | <i>Fam53b</i> | 7 | 0,99±0,07 | 1,22±0,08 | 1,23 | * |
| 2 | 1439677_at | <i>Epm2a</i> | 13 | 1,05±0,07 | 1,28±0,09 | 1,23 | * |
| 2 | 1443148_at | <i>Ube2k</i> | 5 | 1±0,04 | 1,23±0,08 | 1,23 | ** |
| 2 | 1430920_at | <i>Trmt11</i> | 10 | 0,89±0,06 | 1,09±0,09 | 1,23 | * |
| 2 | 1437676_at | <i>Spag9</i> | 11 | 0,92±0,08 | 1,12±0,09 | 1,23 | * |
| 2 | 1439276_at | <i>Adar</i> | 3 | 1,01±0,11 | 1,23±0,1 | 1,23 | * |
| 2 | 1438831_at | <i>Cdk12</i> | 11 | 0,89±0,04 | 1,09±0,07 | 1,23 | * |
| 2 | 1426601_at | <i>Slc37a1</i> | 17 | 1,04±0,08 | 1,27±0,12 | 1,23 | * |
| 2 | 1429902_at | <i>5830443J22Rik</i> | UN | 1,01±0,08 | 1,24±0,12 | 1,23 | * |
| 2 | 1446138_at | <i>Kifap3</i> | 1 | 0,96±0,07 | 1,18±0,09 | 1,23 | * |
| 2 | 1439321_at | <i>Arid1b</i> | 17 | 0,93±0,05 | 1,14±0,14 | 1,23 | * |
| 2 | 1438127_at | <i>LOC552906</i> | UN | 1,01±0,05 | 1,24±0,09 | 1,23 | ** |
| 2 | 1437322_at | <i>Rbm4</i> | 19 | 0,96±0,06 | 1,18±0,07 | 1,23 | * |
| 2 | 1441970_at | <i>E430010N07Rik</i> | UN | 0,92±0,05 | 1,14±0,05 | 1,23 | ** |
| 2 | 1432978_at | <i>9030607L02Rik</i> | UN | 1±0,06 | 1,23±0,11 | 1,23 | * |
| 2 | 1452217_at | <i>Ahnak</i> | 19 | 1,09±0,06 | 1,35±0,07 | 1,23 | ** |
| 2 | 1428989_at | <i>0710001D07Rik</i> | UN | 1,05±0,05 | 1,3±0,08 | 1,24 | * |
| 2 | 1438299_at | <i>9230108I15Rik</i> | UN | 0,98±0,04 | 1,21±0,06 | 1,24 | ** |
| 2 | 1418059_at | <i>Elt1</i> | 3 | 1,17±0,13 | 1,44±0,05 | 1,24 | * |
| 2 | 1429478_at | <i>6720463M24Rik</i> | 14 | 1,06±0,08 | 1,32±0,19 | 1,24 | * |
| 2 | 1436767_at | <i>Gm11889</i> | 4 | 0,99±0,06 | 1,23±0,08 | 1,24 | * |

| | | | | | | | |
|---|--------------|----------------------|----|-----------|-----------|------|-----|
| 2 | 1457223_at | <i>Elmod1</i> | 9 | 0,91±0,06 | 1,13±0,08 | 1,24 | * |
| 2 | 1433944_at | <i>Hectd2</i> | 19 | 0,91±0,07 | 1,13±0,09 | 1,24 | * |
| 2 | 1440892_at | <i>Traf4</i> | 11 | 0,91±0,09 | 1,13±0,08 | 1,24 | * |
| 2 | 1456272_at | <i>Setd5</i> | 6 | 0,98±0,04 | 1,21±0,08 | 1,24 | * |
| 2 | 1457466_at | <i>AA409368</i> | UN | 0,92±0,05 | 1,14±0,1 | 1,24 | * |
| 2 | 1460109_at | <i>Tcf25</i> | 8 | 1,03±0,05 | 1,27±0,04 | 1,24 | *** |
| 2 | 1453251_at | <i>Dhx30</i> | 9 | 0,97±0,03 | 1,21±0,07 | 1,24 | ** |
| 2 | 1457847_at | <i>Rfx7</i> | 9 | 1,01±0,06 | 1,25±0,16 | 1,24 | * |
| 2 | 1458250_at | <i>Fam13c</i> | 10 | 0,97±0,1 | 1,2±0,09 | 1,24 | * |
| 2 | 1445363_at | <i>2810055G20Rik</i> | 16 | 0,94±0,09 | 1,17±0,16 | 1,24 | * |
| 2 | 1430579_at | <i>Tnik</i> | 3 | 1,15±0,19 | 1,43±0,13 | 1,24 | * |
| 2 | 1447025_at | <i>Ube2e2</i> | 14 | 0,97±0,07 | 1,21±0,06 | 1,24 | * |
| 2 | 1431528_at | <i>5830427D02Rik</i> | UN | 0,86±0,07 | 1,07±0,08 | 1,24 | * |
| 2 | 1442311_at | <i>Zfr</i> | 15 | 0,89±0,05 | 1,11±0,1 | 1,25 | * |
| 2 | 1430575_a_at | <i>Tpp2</i> | 1 | 0,92±0,07 | 1,15±0,12 | 1,25 | * |
| 2 | 1442262_at | <i>Foxn3</i> | 12 | 1,03±0,1 | 1,28±0,12 | 1,25 | * |
| 2 | 1444195_at | <i>Rmnd5a</i> | 6 | 1,05±0,07 | 1,3±0,1 | 1,25 | * |
| 2 | 1459434_at | <i>Pdhx</i> | 2 | 0,95±0,07 | 1,19±0,06 | 1,25 | * |
| 2 | 1459311_at | <i>Pde4d</i> | 13 | 0,81±0,07 | 1,01±0,15 | 1,25 | * |
| 2 | 1438752_at | <i>A230058F20Rik</i> | UN | 0,97±0,08 | 1,21±0,07 | 1,25 | * |
| 2 | 1426419_at | <i>Rbm26</i> | 14 | 1,09±0,08 | 1,36±0,14 | 1,25 | * |
| 2 | 1446288_at | <i>C78692</i> | UN | 0,98±0,02 | 1,23±0,13 | 1,25 | * |
| 2 | 1443876_at | <i>Camk2a</i> | 18 | 0,84±0,11 | 1,05±0,16 | 1,25 | * |
| 2 | 1442358_at | <i>AA409587</i> | UN | 0,87±0,08 | 1,08±0,12 | 1,25 | * |
| 2 | 1439572_at | <i>Gm8461</i> | UN | 0,96±0,1 | 1,2±0,11 | 1,25 | * |
| 2 | 1441816_at | <i>2900056M20Rik</i> | X | 1,07±0,06 | 1,34±0,13 | 1,25 | ** |
| 2 | 1430408_at | <i>Cacna1a</i> | 8 | 0,99±0,04 | 1,24±0,13 | 1,25 | * |
| 2 | 1441449_at | <i>Kdm5c</i> | X | 0,87±0,06 | 1,09±0,07 | 1,25 | * |
| 2 | 1444890_at | <i>Mprip</i> | 11 | 1,01±0,07 | 1,26±0,11 | 1,25 | * |
| 2 | 1456413_at | <i>Pde4dip</i> | 3 | 0,87±0,11 | 1,1±0,1 | 1,26 | * |
| 2 | 1429993_s_at | <i>Gm10471</i> | 5 | 0,83±0,12 | 1,04±0,06 | 1,26 | * |
| 2 | 1430077_at | <i>Srsf11</i> | 3 | 0,99±0,06 | 1,24±0,07 | 1,26 | * |
| 2 | 1440639_at | <i>Dlgap1</i> | 17 | 0,93±0,09 | 1,17±0,1 | 1,26 | * |
| 2 | 1444406_at | <i>Map4k3</i> | 17 | 0,8±0,09 | 1,01±0,14 | 1,26 | * |
| 2 | 1458693_at | <i>Scn8a</i> | 15 | 0,89±0,11 | 1,13±0,11 | 1,26 | ** |
| 2 | 1457842_at | <i>Zfp292</i> | 4 | 1±0,05 | 1,26±0,06 | 1,26 | ** |
| 2 | 1458899_at | <i>Usp53</i> | 3 | 1,01±0,09 | 1,28±0,12 | 1,26 | * |
| 2 | 1443534_at | <i>Mbnl1</i> | 3 | 1,02±0,06 | 1,28±0,1 | 1,26 | *** |
| 2 | 1453512_at | <i>5830407P18Rik</i> | UN | 0,9±0,05 | 1,13±0,08 | 1,26 | ** |
| 2 | 1440412_at | <i>Cadm2</i> | 16 | 0,97±0,06 | 1,22±0,11 | 1,26 | * |
| 2 | 1446440_at | <i>Prickle2</i> | 6 | 0,96±0,04 | 1,22±0,11 | 1,26 | * |
| 2 | 1457297_at | <i>Mef2a</i> | 7 | 0,94±0,03 | 1,19±0,04 | 1,26 | ** |
| 2 | 1439090_at | <i>Tbc1d23</i> | 16 | 0,96±0,06 | 1,21±0,12 | 1,27 | * |
| 2 | 1459734_at | <i>Psm14</i> | 2 | 0,96±0,06 | 1,22±0,11 | 1,27 | * |
| 2 | 1456547_at | <i>Ski</i> | 4 | 0,93±0,1 | 1,18±0,05 | 1,27 | ** |
| 2 | 1429846_at | <i>9030411K21Rik</i> | 9 | 0,86±0,06 | 1,09±0,13 | 1,27 | * |
| 2 | 1444458_at | <i>Ctage5</i> | 12 | 0,88±0,15 | 1,12±0,04 | 1,27 | * |
| 2 | 1440977_at | <i>Akap13</i> | 7 | 0,96±0,06 | 1,21±0,07 | 1,27 | ** |

| | | | | | | | |
|---|--------------|----------------------|----|-----------|-----------|------|-----|
| 2 | 1457812_at | <i>Trp53bp1</i> | 2 | 0,88±0,08 | 1,12±0,08 | 1,27 | * |
| 2 | 1445781_at | <i>Sh3d19</i> | 3 | 0,95±0,06 | 1,21±0,08 | 1,27 | * |
| 2 | 1430418_at | <i>Tmem57</i> | 4 | 1,03±0,04 | 1,3±0,07 | 1,27 | * |
| 2 | 1446148_x_at | <i>Rbm39</i> | 2 | 1,02±0,04 | 1,3±0,03 | 1,27 | ** |
| 2 | 1441404_at | <i>Pafah1b1</i> | 11 | 0,92±0,09 | 1,17±0,1 | 1,27 | * |
| 2 | 1424609_a_at | <i>Gm2100</i> | UN | 0,99±0,05 | 1,26±0,11 | 1,27 | * |
| 2 | 1458737_at | <i>C77097</i> | UN | 0,9±0,1 | 1,15±0,13 | 1,27 | * |
| 2 | 1458833_at | <i>Nrcam</i> | 12 | 0,89±0,08 | 1,14±0,09 | 1,27 | * |
| 2 | 1447206_at | <i>Arhgap21</i> | 2 | 0,86±0,06 | 1,1±0,09 | 1,28 | * |
| 2 | 1457366_at | <i>Cdc40</i> | 10 | 0,92±0,07 | 1,18±0,14 | 1,28 | * |
| 2 | 1437660_at | <i>Nktr</i> | 9 | 0,99±0,03 | 1,27±0,12 | 1,28 | * |
| 2 | 1457586_at | <i>Rasa2</i> | 9 | 0,99±0,06 | 1,26±0,07 | 1,28 | ** |
| 2 | 1456715_at | <i>Mycbp2</i> | 14 | 0,89±0,06 | 1,14±0,09 | 1,28 | * |
| 2 | 1442554_s_at | <i>Kalrn</i> | 16 | 0,94±0,06 | 1,21±0,11 | 1,28 | * |
| 2 | 1457410_at | <i>Arhgap5</i> | 12 | 0,95±0,06 | 1,22±0,07 | 1,28 | * |
| 2 | 1436070_at | <i>Atp13a5</i> | 16 | 0,99±0,05 | 1,27±0,08 | 1,28 | ** |
| 2 | 1442111_at | <i>D430033H22Rik</i> | UN | 0,89±0,07 | 1,14±0,1 | 1,28 | * |
| 2 | 1441793_at | <i>Rnf39</i> | 17 | 1,11±0,12 | 1,42±0,22 | 1,28 | * |
| 2 | 1457313_at | <i>Ocrl</i> | X | 0,92±0,1 | 1,18±0,07 | 1,28 | * |
| 2 | 1457510_at | <i>Phf14</i> | 6 | 0,87±0,07 | 1,12±0,07 | 1,28 | * |
| 2 | 1446332_at | <i>Pcdhga11</i> | 18 | 0,94±0,04 | 1,21±0,11 | 1,28 | * |
| 2 | 1438828_at | <i>Rapgef6</i> | 11 | 0,84±0,07 | 1,08±0,07 | 1,28 | * |
| 2 | 1446797_at | <i>A330075M08Rik</i> | UN | 0,92±0,08 | 1,18±0,1 | 1,29 | * |
| 2 | 1444599_at | <i>Herc4</i> | 10 | 1,11±0,13 | 1,42±0,13 | 1,29 | * |
| 2 | 1441351_at | <i>Ankib1</i> | 5 | 0,93±0,12 | 1,2±0,14 | 1,29 | * |
| 2 | 1441362_at | <i>Ptprg</i> | 14 | 0,85±0,07 | 1,1±0,13 | 1,29 | * |
| 2 | 1457152_at | <i>Kcnb2</i> | 1 | 0,9±0,08 | 1,16±0,15 | 1,29 | * |
| 2 | 1440533_at | <i>Bfar</i> | 16 | 1,14±0,2 | 1,47±0,13 | 1,29 | * |
| 2 | 1457464_at | <i>C130015C19</i> | UN | 0,89±0,08 | 1,15±0,1 | 1,29 | ** |
| 2 | 1444746_at | <i>Ptbp2</i> | 3 | 1,1±0,12 | 1,43±0,13 | 1,29 | * |
| 2 | 1440647_at | <i>Sipa1l1</i> | 12 | 0,93±0,07 | 1,2±0,1 | 1,29 | ** |
| 2 | 1442223_at | <i>Enah</i> | 1 | 0,94±0,06 | 1,22±0,1 | 1,29 | ** |
| 2 | 1429177_x_at | <i>Sox17</i> | 1 | 1,23±0,2 | 1,59±0,18 | 1,29 | * |
| 2 | 1446481_at | <i>Apbb2</i> | 5 | 0,96±0,1 | 1,24±0,12 | 1,29 | ** |
| 2 | 1440310_at | <i>Runx1t1</i> | 4 | 1,03±0,11 | 1,33±0,18 | 1,29 | * |
| 2 | 1458176_at | <i>Per3</i> | 4 | 1±0,07 | 1,3±0,07 | 1,29 | ** |
| 2 | 1459857_at | <i>Usp32</i> | 11 | 0,93±0,07 | 1,21±0,09 | 1,29 | * |
| 2 | 1442163_at | <i>Hace1</i> | 10 | 0,92±0,14 | 1,19±0,16 | 1,30 | * |
| 2 | 1430035_at | <i>Ccdc132</i> | 6 | 1,15±0,14 | 1,49±0,16 | 1,30 | * |
| 2 | 1434522_at | <i>Wdr4</i> | 17 | 0,99±0,01 | 1,29±0,05 | 1,30 | *** |
| 2 | 1443166_at | <i>Rprd1a</i> | 18 | 0,97±0,06 | 1,26±0,1 | 1,30 | ** |
| 2 | 1441181_at | <i>Rbm6</i> | 9 | 0,94±0,04 | 1,22±0,1 | 1,30 | ** |
| 2 | 1443388_at | <i>Rnf8</i> | 17 | 1,07±0,08 | 1,38±0,05 | 1,30 | ** |
| 2 | 1442320_at | <i>LOC553096</i> | UN | 0,89±0,1 | 1,15±0,13 | 1,30 | * |
| 2 | 1440573_at | <i>Gm2590</i> | UN | 0,9±0,09 | 1,16±0,05 | 1,30 | * |
| 2 | 1459357_at | <i>Nfasc</i> | 1 | 1±0,07 | 1,3±0,11 | 1,30 | * |
| 2 | 1445481_at | <i>AI317158</i> | UN | 0,89±0,1 | 1,16±0,12 | 1,30 | * |
| 2 | 1448962_at | <i>Myh11</i> | 16 | 1,2±0,12 | 1,57±0,3 | 1,30 | * |

| | | | | | | | |
|---|--------------|----------------------|----|-----------|-----------|------|-----|
| 2 | 1458056_at | <i>Srek1</i> | 13 | 0,89±0,06 | 1,16±0,1 | 1,30 | * |
| 2 | 1439138_at | <i>2310035C23Rik</i> | 1 | 0,91±0,11 | 1,19±0,11 | 1,30 | *** |
| 2 | 1432007_s_at | <i>Ap2a2</i> | 7 | 0,96±0,05 | 1,26±0,15 | 1,30 | * |
| 2 | 1439209_at | <i>Tcf12</i> | 9 | 0,96±0,03 | 1,25±0,07 | 1,31 | ** |
| 2 | 1459632_at | <i>Crim1</i> | 17 | 1,07±0,07 | 1,39±0,16 | 1,31 | * |
| 2 | 1444869_at | <i>Gphn</i> | 12 | 1,06±0,11 | 1,39±0,05 | 1,31 | * |
| 2 | 1429977_at | <i>9030425L15Rik</i> | UN | 0,81±0,11 | 1,06±0,16 | 1,31 | * |
| 2 | 1443535_at | <i>Rabgap1</i> | 2 | 0,95±0,09 | 1,24±0,09 | 1,31 | ** |
| 2 | 1441153_at | <i>Utrn</i> | 10 | 0,92±0,07 | 1,2±0,15 | 1,31 | * |
| 2 | 1456916_at | <i>Nsd1</i> | 13 | 0,92±0,06 | 1,21±0,06 | 1,31 | ** |
| 2 | 1444268_at | <i>BC004004</i> | 17 | 0,95±0,09 | 1,25±0,14 | 1,31 | * |
| 2 | 1458947_at | <i>2010111101Rik</i> | 13 | 0,97±0,07 | 1,27±0,1 | 1,31 | ** |
| 2 | 1439702_at | <i>Myt1l</i> | 12 | 0,9±0,09 | 1,18±0,11 | 1,31 | * |
| 2 | 1453529_at | <i>6330418B08Rik</i> | UN | 0,97±0,11 | 1,27±0,13 | 1,31 | ** |
| 2 | 1459453_at | <i>Robo1</i> | 16 | 0,85±0,07 | 1,12±0,09 | 1,32 | * |
| 2 | 1430195_at | <i>2810043O03Rik</i> | UN | 0,88±0,05 | 1,16±0,11 | 1,32 | * |
| 2 | 1432151_at | <i>9330177L23Rik</i> | UN | 1,01±0,04 | 1,33±0,01 | 1,32 | *** |
| 2 | 1432686_at | <i>4833406M21Rik</i> | UN | 1,03±0,08 | 1,36±0,09 | 1,32 | * |
| 2 | 1447064_at | <i>Ubn2</i> | 6 | 0,89±0,07 | 1,18±0,17 | 1,32 | * |
| 2 | 1457205_at | <i>Nsf</i> | 11 | 0,88±0,12 | 1,16±0,12 | 1,32 | ** |
| 2 | 1439926_at | <i>Heg1</i> | 16 | 0,92±0,05 | 1,21±0,19 | 1,32 | * |
| 2 | 1438130_at | <i>Taf15</i> | 11 | 0,97±0,09 | 1,28±0,07 | 1,32 | * |
| 2 | 1443006_at | <i>Fbxo7</i> | 10 | 0,96±0,09 | 1,26±0,19 | 1,32 | * |
| 2 | 1458697_at | <i>LOC100044318</i> | UN | 1,01±0,05 | 1,34±0,16 | 1,32 | * |
| 2 | 1459098_at | <i>Dst</i> | 1 | 0,94±0,06 | 1,24±0,12 | 1,32 | ** |
| 2 | 1439929_at | <i>Mfhas1</i> | 8 | 0,97±0,07 | 1,28±0,14 | 1,32 | * |
| 2 | 1445531_at | <i>Csmd1</i> | 8 | 0,9±0,08 | 1,2±0,14 | 1,32 | * |
| 2 | 1440637_at | <i>Itsn1</i> | 16 | 0,86±0,09 | 1,15±0,12 | 1,32 | ** |
| 2 | 1447020_at | <i>Zfpm2</i> | 15 | 0,9±0,11 | 1,19±0,19 | 1,32 | * |
| 2 | 1433388_at | <i>2900022M07Rik</i> | UN | 0,9±0,07 | 1,2±0,09 | 1,33 | * |
| 2 | 1441354_at | <i>AU018740</i> | UN | 0,89±0,1 | 1,19±0,09 | 1,33 | * |
| 2 | 1441266_at | <i>Strn3</i> | 12 | 0,97±0,04 | 1,29±0,09 | 1,33 | ** |
| 2 | 1440764_at | <i>Araf</i> | X | 0,89±0,07 | 1,18±0,13 | 1,33 | * |
| 2 | 1442710_at | <i>Pdlim5</i> | 3 | 0,96±0,06 | 1,28±0,09 | 1,33 | ** |
| 2 | 1429996_at | <i>6330417A16Rik</i> | UN | 0,96±0,07 | 1,28±0,09 | 1,33 | * |
| 2 | 1439678_at | <i>Gls</i> | 1 | 0,99±0,11 | 1,32±0,08 | 1,33 | ** |
| 2 | 1453514_at | <i>Gpm6b</i> | X | 0,98±0,13 | 1,3±0,1 | 1,33 | * |
| 2 | 1438528_at | <i>Pcm1</i> | 8 | 0,91±0,09 | 1,22±0,09 | 1,33 | * |
| 2 | 1446127_at | <i>Zeb1</i> | 18 | 0,88±0,11 | 1,17±0,14 | 1,33 | * |
| 2 | 1432294_at | <i>LOC100044842</i> | UN | 0,81±0,14 | 1,08±0,16 | 1,33 | * |
| 2 | 1456955_at | <i>Pppde1</i> | 1 | 0,91±0,07 | 1,22±0,1 | 1,33 | * |
| 2 | 1444034_at | <i>Rapgef4</i> | 2 | 0,92±0,08 | 1,23±0,12 | 1,34 | * |
| 2 | 1441187_at | <i>E330037M01Rik</i> | UN | 0,94±0,07 | 1,25±0,13 | 1,34 | * |
| 2 | 1457712_at | <i>Chd8</i> | 14 | 0,88±0,08 | 1,18±0,12 | 1,34 | ** |
| 2 | 1456526_at | <i>C130034I24Rik</i> | UN | 0,89±0,08 | 1,19±0,13 | 1,34 | * |
| 2 | 1447478_at | <i>Lrp1b</i> | 2 | 0,89±0,11 | 1,19±0,09 | 1,34 | * |
| 2 | 1441253_at | <i>Rfx3</i> | 19 | 0,88±0,08 | 1,17±0,11 | 1,34 | * |
| 2 | 1459157_at | <i>Stox2</i> | 8 | 0,98±0,12 | 1,31±0,13 | 1,34 | * |

| | | | | | | | |
|---|--------------|----------------------|----|-----------|-----------|------|-----|
| 2 | 1438995_at | <i>Fam65b</i> | 13 | 1±0,04 | 1,34±0,18 | 1,34 | * |
| 2 | 1453976_at | <i>4432414F05Rik</i> | UN | 1,21±0,25 | 1,62±0,23 | 1,34 | * |
| 2 | 1458161_at | <i>Kcnq1ot1</i> | 7 | 0,93±0,07 | 1,24±0,1 | 1,34 | * |
| 2 | 1438892_at | <i>Ptprj</i> | UN | 0,88±0,08 | 1,18±0,04 | 1,34 | ** |
| 2 | 1460511_at | <i>Pkp2</i> | 16 | 0,73±0,11 | 0,98±0,19 | 1,34 | * |
| 2 | 1458167_at | <i>A130049L09Rik</i> | UN | 0,95±0,06 | 1,27±0,11 | 1,34 | ** |
| 2 | 1441140_at | <i>Rere</i> | 4 | 0,91±0,08 | 1,22±0,13 | 1,35 | * |
| 2 | 1441440_at | <i>Atg4c</i> | 4 | 1,03±0,08 | 1,38±0,09 | 1,35 | ** |
| 2 | 1457169_at | <i>Ppp1r12b</i> | 1 | 0,91±0,08 | 1,23±0,2 | 1,35 | * |
| 2 | 1433040_at | <i>2900018E21Rik</i> | UN | 0,88±0,05 | 1,18±0,13 | 1,35 | * |
| 2 | 1442749_at | <i>Braf</i> | 6 | 0,89±0,09 | 1,21±0,18 | 1,35 | * |
| 2 | 1432944_at | <i>2900046L07Rik</i> | UN | 0,85±0,12 | 1,14±0,17 | 1,35 | * |
| 2 | 1441507_at | <i>Spnb2</i> | 11 | 1±0,08 | 1,35±0,14 | 1,35 | * |
| 2 | 1459560_at | <i>Spopl</i> | 2 | 0,89±0,07 | 1,2±0,13 | 1,35 | * |
| 2 | 1432352_at | <i>Ccny</i> | 18 | 0,91±0,06 | 1,24±0,13 | 1,35 | * |
| 2 | 1444617_at | <i>Cacnb2</i> | 2 | 0,83±0,09 | 1,13±0,15 | 1,36 | * |
| 2 | 1447117_at | <i>Lrrtm1</i> | 6 | 0,94±0,08 | 1,28±0,09 | 1,36 | ** |
| 2 | 1424628_a_at | <i>Ndufv3</i> | 17 | 1,04±0,03 | 1,42±0,07 | 1,36 | *** |
| 2 | 1442445_at | <i>2610027H17Rik</i> | UN | 0,8±0,09 | 1,08±0,11 | 1,36 | * |
| 2 | 1438878_at | <i>6430537K16Rik</i> | UN | 1,08±0,15 | 1,47±0,25 | 1,36 | * |
| 2 | 1444194_at | <i>Mllt10</i> | 2 | 0,87±0,06 | 1,18±0,13 | 1,37 | * |
| 2 | 1430808_at | <i>Tbc1d5</i> | 17 | 0,88±0,08 | 1,21±0,13 | 1,37 | * |
| 2 | 1445779_at | <i>Grid1</i> | 14 | 1±0,07 | 1,37±0,17 | 1,37 | * |
| 2 | 1446197_at | <i>Lphn3</i> | 5 | 0,96±0,07 | 1,31±0,09 | 1,37 | ** |
| 2 | 1439948_at | <i>BC046401</i> | 2 | 0,85±0,11 | 1,16±0,18 | 1,37 | * |
| 2 | 1441624_at | <i>Sorbs2</i> | 8 | 0,88±0,08 | 1,2±0,12 | 1,37 | * |
| 2 | 1457189_at | <i>Itpr1</i> | 6 | 0,92±0,09 | 1,26±0,2 | 1,37 | * |
| 2 | 1454141_at | <i>5730416O20Rik</i> | UN | 0,95±0,06 | 1,31±0,1 | 1,37 | ** |
| 2 | 1433384_at | <i>9330199C07Rik</i> | UN | 0,87±0,07 | 1,19±0,13 | 1,37 | * |
| 2 | 1441843_s_at | <i>5230400M03Rik</i> | 2 | 0,89±0,08 | 1,23±0,17 | 1,37 | * |
| 2 | 1456864_at | <i>BC002059</i> | 17 | 0,97±0,08 | 1,33±0,12 | 1,37 | * |
| 2 | 1431725_at | <i>Fmn2</i> | 1 | 0,91±0,09 | 1,25±0,14 | 1,38 | * |
| 2 | 1447408_at | <i>Nipbl</i> | 15 | 0,88±0,1 | 1,21±0,11 | 1,38 | * |
| 2 | 1441114_at | <i>9330156P08Rik</i> | UN | 0,9±0,09 | 1,24±0,13 | 1,38 | * |
| 2 | 1458809_at | <i>Tusc3</i> | 8 | 0,94±0,11 | 1,3±0,12 | 1,38 | * |
| 2 | 1432713_at | <i>6430709C05Rik</i> | UN | 0,88±0,1 | 1,21±0,19 | 1,38 | * |
| 2 | 1451240_a_at | <i>Glo1</i> | 17 | 1,06±0,05 | 1,47±0,07 | 1,38 | *** |
| 2 | 1445498_at | <i>Ryr2</i> | 13 | 0,89±0,1 | 1,23±0,06 | 1,38 | ** |
| 2 | 1446012_at | <i>D9Ertd292e</i> | 9 | 0,98±0,1 | 1,35±0,07 | 1,38 | ** |
| 2 | 1433015_at | <i>6330436F06Rik</i> | UN | 0,93±0,07 | 1,29±0,16 | 1,39 | * |
| 2 | 1447609_at | <i>Sybu</i> | 15 | 0,86±0,1 | 1,19±0,12 | 1,39 | * |
| 2 | 1440461_at | <i>Fam49b</i> | 15 | 0,93±0,06 | 1,29±0,11 | 1,39 | ** |
| 2 | 1441487_at | <i>Trim2</i> | 3 | 0,83±0,11 | 1,16±0,18 | 1,39 | * |
| 2 | 1439895_at | <i>AU021025</i> | UN | 0,86±0,12 | 1,19±0,18 | 1,39 | * |
| 2 | 1442557_at | <i>Syt1</i> | 10 | 0,9±0,13 | 1,25±0,15 | 1,39 | * |
| 2 | 1446364_at | <i>Wwp1</i> | 4 | 0,74±0,13 | 1,04±0,19 | 1,39 | * |
| 2 | 1457146_at | <i>Dock4</i> | 12 | 0,88±0,08 | 1,22±0,08 | 1,39 | ** |
| 2 | 1445398_at | <i>Limch1</i> | 5 | 0,89±0,09 | 1,25±0,11 | 1,40 | ** |

| | | | | | | | |
|---|------------|---------------|----|-----------|-----------|------|----|
| 2 | 1429694_at | 4930402H24Rik | 2 | 1,01±0,04 | 1,4±0,07 | 1,40 | ** |
| 2 | 1458525_at | App | 16 | 1,02±0,09 | 1,43±0,17 | 1,40 | * |
| 2 | 1440717_at | AA407881 | UN | 0,96±0,07 | 1,36±0,13 | 1,40 | ** |
| 2 | 1443471_at | Zbtb20 | 16 | 0,79±0,08 | 1,11±0,12 | 1,41 | * |
| 2 | 1433209_at | 2210017G18Rik | UN | 0,88±0,08 | 1,24±0,12 | 1,41 | * |
| 2 | 1436864_at | Luc7l2 | 6 | 0,97±0,06 | 1,36±0,1 | 1,41 | ** |
| 2 | 1458205_at | Man1a | 10 | 0,92±0,06 | 1,3±0,07 | 1,41 | ** |
| 2 | 1440011_at | Ext1 | 15 | 0,93±0,09 | 1,31±0,19 | 1,41 | * |
| 2 | 1431300_at | Sgip1 | 4 | 0,91±0,08 | 1,28±0,14 | 1,41 | * |
| 2 | 1458779_at | 8030445P17Rik | UN | 0,85±0,13 | 1,21±0,16 | 1,41 | * |
| 2 | 1460536_at | 2310079F09Rik | UN | 0,84±0,09 | 1,19±0,18 | 1,42 | * |
| 2 | 1430585_at | 5930436O19Rik | UN | 0,88±0,07 | 1,24±0,17 | 1,42 | * |
| 2 | 1449403_at | Pde9a | 17 | 1,02±0,05 | 1,45±0,21 | 1,42 | * |
| 2 | 1442609_at | Prkce | 17 | 0,8±0,15 | 1,14±0,12 | 1,42 | * |
| 2 | 1440317_at | C130068B02Rik | UN | 0,89±0,08 | 1,26±0,13 | 1,42 | ** |
| 2 | 1443526_at | Phf21a | 2 | 0,85±0,1 | 1,2±0,12 | 1,42 | * |
| 2 | 1458942_at | C230037E05Rik | UN | 0,92±0,05 | 1,32±0,09 | 1,43 | ** |
| 2 | 1431118_at | 6720427H10Rik | UN | 0,94±0,08 | 1,35±0,2 | 1,43 | * |
| 2 | 1446286_at | Kirrel3 | 9 | 0,87±0,1 | 1,25±0,12 | 1,43 | ** |
| 2 | 1433325_at | 9330154F10Rik | UN | 0,89±0,13 | 1,28±0,1 | 1,43 | ** |
| 2 | 1443533_at | Ppp2r5e | 12 | 0,97±0,08 | 1,39±0,19 | 1,43 | * |
| 2 | 1460092_at | Lsamp | 16 | 0,92±0,09 | 1,31±0,14 | 1,43 | * |
| 2 | 1438245_at | Nfib | 4 | 0,84±0,1 | 1,21±0,16 | 1,43 | * |
| 2 | 1443153_at | Trip11 | 12 | 0,94±0,09 | 1,35±0,12 | 1,44 | ** |
| 2 | 1441547_at | Nfia | 4 | 0,84±0,08 | 1,21±0,19 | 1,44 | * |
| 2 | 1441606_at | A830055N07Rik | UN | 0,88±0,11 | 1,27±0,19 | 1,44 | * |
| 2 | 1447259_at | Ank3 | 10 | 0,94±0,12 | 1,36±0,14 | 1,44 | ** |
| 2 | 1445984_at | Cdk14 | 5 | 0,82±0,1 | 1,17±0,17 | 1,44 | * |
| 2 | 1444384_at | Dctn5 | 7 | 0,9±0,06 | 1,3±0,18 | 1,44 | * |
| 2 | 1458263_at | Celf2 | 2 | 0,83±0,11 | 1,2±0,1 | 1,44 | * |
| 2 | 1442561_at | Mdga2 | 12 | 0,92±0,09 | 1,33±0,16 | 1,44 | * |
| 2 | 1456960_at | Adk | 14 | 1,08±0,08 | 1,56±0,2 | 1,44 | * |
| 2 | 1459011_at | Btbd9 | 17 | 0,88±0,06 | 1,28±0,14 | 1,45 | ** |
| 2 | 1447024_at | Cspp1 | 1 | 0,92±0,11 | 1,33±0,13 | 1,45 | ** |
| 2 | 1443589_at | DXErtD242e | X | 0,75±0,12 | 1,09±0,16 | 1,45 | * |
| 2 | 1443018_at | Ncam1 | 9 | 0,84±0,09 | 1,23±0,15 | 1,46 | * |
| 2 | 1446001_at | Dtnb | 12 | 0,8±0,09 | 1,17±0,18 | 1,46 | * |
| 2 | 1422272_at | Phxr4 | 9 | 0,85±0,09 | 1,24±0,17 | 1,46 | * |
| 2 | 1459537_at | Ahcyl2 | 6 | 0,88±0,05 | 1,29±0,16 | 1,46 | ** |
| 2 | 1442715_at | Tsga8 | X | 0,91±0,13 | 1,33±0,14 | 1,47 | * |
| 2 | 1445111_at | Exoc4 | 6 | 0,9±0,06 | 1,31±0,15 | 1,47 | * |
| 2 | 1455967_at | Sorbs1 | 19 | 0,94±0,04 | 1,39±0,21 | 1,47 | * |
| 2 | 1446190_at | Dclk1 | 3 | 0,96±0,09 | 1,42±0,09 | 1,47 | * |
| 2 | 1430183_at | 4833414E09Rik | UN | 0,89±0,09 | 1,31±0,16 | 1,47 | * |
| 2 | 1456808_at | 4933426M11Rik | 12 | 0,76±0,14 | 1,13±0,21 | 1,48 | * |
| 2 | 1430791_at | 6330415B21Rik | 6 | 0,87±0,1 | 1,29±0,13 | 1,48 | * |
| 2 | 1444488_at | Cadps | 14 | 0,88±0,1 | 1,31±0,13 | 1,48 | ** |
| 2 | 1439839_at | D130051D11Rik | UN | 1,11±0,17 | 1,66±0,13 | 1,49 | * |

| | | | | | | | |
|---|--------------|----------------------|----|-----------|-----------|------|-----|
| 2 | 1429951_at | <i>Ssbp2</i> | 13 | 1,06±0,11 | 1,59±0,2 | 1,49 | * |
| 2 | 1441535_at | <i>Mllt3</i> | 4 | 0,94±0,11 | 1,42±0,24 | 1,50 | * |
| 2 | 1460113_at | <i>B930093H17Rik</i> | UN | 0,77±0,1 | 1,15±0,12 | 1,50 | * |
| 2 | 1452500_at | <i>Tmlhe</i> | UN | 0,84±0,08 | 1,25±0,15 | 1,50 | * |
| 2 | 1445561_at | <i>B130020M22Rik</i> | UN | 0,96±0,07 | 1,44±0,2 | 1,50 | * |
| 2 | 1459214_at | <i>Odz2</i> | 11 | 0,89±0,11 | 1,33±0,18 | 1,50 | * |
| 2 | 1459463_at | <i>Nptn</i> | 9 | 0,87±0,1 | 1,31±0,17 | 1,50 | * |
| 2 | 1447096_at | <i>Pbx1</i> | 1 | 0,94±0,07 | 1,41±0,24 | 1,51 | * |
| 2 | 1441558_at | <i>D230044B12Rik</i> | UN | 0,89±0,08 | 1,34±0,18 | 1,51 | * |
| 2 | 1441769_at | <i>Arl15</i> | 13 | 0,97±0,09 | 1,46±0,19 | 1,51 | ** |
| 2 | 1425623_a_at | <i>Cbs</i> | 17 | 1±0,03 | 1,53±0,06 | 1,53 | *** |
| 2 | 1441679_at | <i>Cacna1c</i> | 6 | 0,81±0,13 | 1,24±0,24 | 1,53 | ** |
| 2 | 1446279_at | <i>Negr1</i> | 3 | 0,87±0,14 | 1,34±0,17 | 1,54 | ** |
| 2 | 1460101_at | <i>Nrxn3</i> | 12 | 0,78±0,1 | 1,2±0,16 | 1,54 | * |
| 2 | 1446537_at | <i>Kcnq5</i> | 1 | 0,88±0,14 | 1,35±0,18 | 1,54 | * |
| 2 | 1442813_at | <i>Dgki</i> | 6 | 0,96±0,17 | 1,5±0,22 | 1,55 | * |
| 2 | 1459409_at | <i>Ccdc109a</i> | 10 | 0,8±0,11 | 1,23±0,16 | 1,55 | * |
| 2 | 1439174_at | <i>Unc5c</i> | 3 | 0,84±0,11 | 1,3±0,17 | 1,55 | * |
| 2 | 1454510_at | <i>2900034C19Rik</i> | UN | 0,84±0,11 | 1,31±0,21 | 1,56 | * |
| 2 | 1440570_at | <i>Lhfp13</i> | 5 | 1±0,07 | 1,56±0,25 | 1,57 | * |
| 2 | 1459483_at | <i>Fam155a</i> | 8 | 0,86±0,08 | 1,35±0,17 | 1,57 | * |
| 2 | 1440513_at | <i>C80258</i> | UN | 0,98±0,08 | 1,54±0,33 | 1,57 | * |
| 2 | 1458555_at | <i>AU022229</i> | UN | 0,93±0,06 | 1,46±0,17 | 1,57 | ** |
| 2 | 1431248_at | <i>5031426D15Rik</i> | 2 | 0,85±0,12 | 1,34±0,23 | 1,58 | * |
| 2 | 1458663_at | <i>Large</i> | 8 | 0,91±0,09 | 1,43±0,21 | 1,58 | * |
| 2 | 1445148_at | <i>Akr1b3</i> | 6 | 0,81±0,08 | 1,29±0,18 | 1,59 | * |
| 2 | 1443175_at | <i>A830010M09Rik</i> | UN | 0,8±0,14 | 1,27±0,13 | 1,59 | * |
| 2 | 1442752_at | <i>Opcml</i> | 9 | 0,79±0,14 | 1,26±0,25 | 1,59 | * |
| 2 | 1430965_at | <i>9430064K01Rik</i> | UN | 0,87±0,13 | 1,4±0,16 | 1,60 | * |
| 2 | 1431473_at | <i>5330423I11Rik</i> | UN | 0,8±0,15 | 1,29±0,23 | 1,61 | * |
| 2 | 1429900_at | <i>5330406M23Rik</i> | UN | 0,84±0,1 | 1,35±0,29 | 1,61 | * |
| 2 | 1440586_at | <i>B430203I24Rik</i> | UN | 0,83±0,13 | 1,34±0,2 | 1,61 | * |
| 2 | 1445518_at | <i>Zeb2</i> | 2 | 0,79±0,13 | 1,27±0,15 | 1,62 | * |
| 2 | 1439586_at | <i>LOC548102</i> | UN | 0,74±0,14 | 1,21±0,27 | 1,63 | * |
| 2 | 1444973_at | <i>Kcnma1</i> | 14 | 0,96±0,04 | 1,57±0,31 | 1,64 | * |
| 2 | 1446598_at | <i>Prkca</i> | 11 | 0,92±0,07 | 1,5±0,27 | 1,64 | * |
| 2 | 1430770_at | <i>3110080E11Rik</i> | UN | 0,89±0,13 | 1,46±0,28 | 1,64 | * |
| 2 | 1433184_at | <i>6720477C19Rik</i> | UN | 0,89±0,11 | 1,46±0,2 | 1,64 | ** |
| 2 | 1458830_at | <i>Fgf14</i> | 14 | 0,88±0,14 | 1,45±0,25 | 1,65 | * |
| 2 | 1459160_at | <i>Shisa6</i> | 11 | 0,75±0,16 | 1,25±0,2 | 1,68 | ** |
| 2 | 1430379_at | <i>5830411K21Rik</i> | UN | 0,8±0,12 | 1,34±0,15 | 1,68 | * |
| 2 | 1429906_at | <i>A930035E12Rik</i> | UN | 0,87±0,14 | 1,48±0,19 | 1,71 | ** |
| 2 | 1459369_at | <i>Epha6</i> | 16 | 0,77±0,14 | 1,35±0,15 | 1,75 | ** |
| 2 | 1429703_at | <i>2900072G11Rik</i> | UN | 0,73±0,15 | 1,29±0,24 | 1,77 | ** |
| 2 | 1445695_at | <i>Atxn1</i> | 13 | 0,98±0,07 | 1,76±0,24 | 1,79 | ** |
| 2 | 1454592_at | <i>9430012M22Rik</i> | UN | 0,84±0,16 | 1,51±0,17 | 1,79 | ** |
| 2 | 1442924_at | <i>Clstn2</i> | 9 | 0,89±0,16 | 1,68±0,41 | 1,88 | * |
| 2 | 1454472_at | <i>2900092N22Rik</i> | UN | 0,78±0,11 | 1,62±0,38 | 2,07 | * |

| | | | | | | | |
|---|------------|--------------|----|-----------|------------|-------|-----|
| 2 | 1420516_at | <i>a</i> | 2 | 0,85±0,11 | 4,2±0,64 | 4,93 | ** |
| 2 | 1458719_at | <i>Glp1r</i> | 17 | 0,71±0,12 | 16,81±2,58 | 23,68 | *** |

Figure 68 Table récapitulative de l'ensemble des gènes dérégulés dans l'hippocampe des souris *Ts1Yah*. (Test post hoc student ; * pour $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

**Monosomy of the *Abcg1–U2af1* genetic interval produces larger CA1 LTP
and increased fear memory**

AUTHORS

Ignasi Sahún^{1,*}, Damien Marechal^{2,*}, Patricia Lopes Pereira³, Valérie Nalesso², Agnès Gruart⁴, José María Delgado García⁴, Stylianos E. Antonarakis⁵, Mara Dierssen^{1,#} and Yann Hérault^{2,3,**#}

Affiliations

¹Genes and Disease Program, Center for Genomic Regulation (CRG), and CIBER de Enfermedades Raras, Dr Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain

²Institut de Génétique Biologie Moléculaire et Cellulaire and Institut Clinique de la Souris, IGBMC/ICS, CNRS, INSERM, Université de Strasbourg, UMR7104, UMR964, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France

³Transgenèse et Archivage Animaux Modèles, TAAM, CNRS, UPS44, 3B rue de la Férollerie, 45071 Orléans, France

⁴División de Neurociencias, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, Spain

⁵Department of Genetic Medicine and Development, University of Geneva Medical School, 1 Rue Michel-Servet, 1211 Geneva, Switzerland.

* Co-authorship

Joint leadership

** To whom correspondence should be addressed

Running head: gene dosage, Down syndrome, mouse model, LTP, Mmu17

ABSTRACT

The *Abcg1-U2af1* genetic region contributes to cognitive defect in working and short-term recognition memory in Down syndrome models. However, increase in copy number of the *Abcg1-U2af1* interval led to an unexpected gain of hippocampal function. We here analyze the impact of monosomy of the *Abcg1-U2af1* genetic interval on the hippocampus using a new monosomic mouse model, Ms2Yah. We have characterized various functional domains using behavioral and electrophysiological studies, and could not detect defects in the performance of neither the object recognition nor the Morris water maze tests. However, monosomy of the *Abcg1-U2af1* genetic interval led to increased associative memory in the fear-conditioning test and showed a larger LTP induction in the CA1 area following stimulation of Schaffer collaterals. Whole genome expression studies carried out on the hippocampus showed that only the transcription of a small number of genes is affected, mainly those from the genetic interval (*Cbs*, *Rsph1*, *Wdr4*, etc.), and a few additional ones, including *Tmem72* and *Zic1*. We conclude that the *Abcg1-U2af1* region is undeniably encompassing dosage sensitive genes that act directly on learning and memory.

INTRODUCTION

Genomic aneuploidy, defined as an abnormal number of copies of a genomic region, is a common cause of human genetic disorders. Down syndrome (DS) is a chromosomal aneuploidy characterized by the presence of a supernumerary copy of the whole or part of human chromosome 21 (Hsa21) that gives rise to syndromic intellectual disability. Although classically research has focused in the search of candidate genes, exciting new findings are demonstrating that in addition to direct and indirect alteration of expression of Hsa21 and non-Hsa21 genes, we have to consider that DS phenotype may also be due to copy number alteration of functional, non-traditional genomic elements.

Several “dosage sensitive” regions, which include genes and non-coding conserved elements, have been mapped across the length of Hsa21 and shown to be sufficient for induction of the complete DS phenotype (Korbel et al., 2009; Lyle et al., 2009). The results of such studies provide initial evidence supporting the hypothesis that some of the phenotypes of DS are due not to specific genes, but rather, to the over/underexpression of a whole chromosomal domain (Umlauf, Fraser, & Nagano, 2008). Until recently, mouse models available did not completely explain the complexity and variability of some phenotypes observed in DS patients probably because they left unexplored the contribution of the gene-rich telomeric part of the Hsa21 that maps to the mouse chromosomes Mmu17, Mmu16 and Mmu10. Thus, we and others generated additional monosomic (Ms) and trisomic (Ts) models to evaluate the contribution of genes or other functional elements within the complete Hsa21 to DS phenotypes (Duchon, Pothion, et al., 2011; Reeves et al., 1995; Yu, Li, et al., 2010). We previously evaluated the effects of the trisomy of the *Abcg1–U2af1* genetic interval from the telomeric part of Hsa21 to DS, in a mouse model named Ts1Yah (Lopes Pereira et al., 2009). Ts1Yah mice showed defects in novel object recognition, open-field and

Y-maze tests, similar to other DS models, but the trisomy induced an improvement of the hippocampal-dependent spatial memory in the Morris water maze along with enhanced and longer lasting *in vivo* long-term potentiation (LTP) in the hippocampus. These results were confirmed in another model for the *Abcg1-U2af1* interval (Yu, Liu, et al., 2010). To analyze the dosage-sensitivity of this particular region, in the present study we have generated the corresponding monosomy model of the Ts1Yah, named Ms2Yah. Although we initially expected to find a phenotype opposite to that observed in the Ts1Yah, we could not detect changes in the performance of neither the object recognition nor the Morris water maze tests. Surprisingly, monosomy of the *Abcg1-U2af1* genetic interval led to increased associative memory in the fear-conditioning test along with a significant increase in *in vivo* LTP. Using transcriptome approach, we observed a circumscribed effect of the monosomy with decreased expression of genes located in the *Abcg1-U2af1* region but of few additional found elsewhere in the genome, indicating the contribution of genes from the interval to specific learning and memory processes.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement

Experiments were performed with the approval of the local ethical committee and in accordance with the European Council Guidelines for the Care and Use of Laboratory animals (accreditation 7320). They were housed under a 12 h/12 h light-dark cycle in ICS mouse facility in Illkirch (certificate C45-234-6) and shipped by authorized carriers to Barcelona for the behavioral assessment or to Sevilla for the *in vivo* LTP experiments. Dr Herauld, as the principal investigator in this study, was granted the accreditation 45-31 and 67-369 to perform the reported experiments with Dr. Dierssen and Dr. Delgado-Garcia. The experimental procedures were carried out in the animal facility of the Barcelona Biomedical Research Parc (PRBB). Behavioral procedures were approved by the local ethical committee (CEEA-PRBB), and met the guidelines of the local (Catalan law 5/1995 and Decrees 214/97, 32/2007) and European regulations (EU directives nº 86/609 and 2001-486)

Mouse Genotyping

For genotype identification, genomic DNA was isolated from tail biopsies using the NaCl precipitation technique. The Ms2Yah allele was identified by a 3 primers PCR using one common Fwd primer (5'-CCAGCTGAAGATGGGTGTGTCTGC-3'), and one Rev primer (5'-AGCCTTCCCTGGGGACCTGAAA-3') specific for the wt allele and one Ms2Yah Rev primer (5'-AACGACCGAGCGCAGCGA-3') specific for the mutant. PCR reactions gave wt and Ms2Yah products of 468bp and 272 bp respectively.

Behavioral analysis

We used 3-4 months old monosomic Ms2Yah males compared to their wild-type littermates (WT n = 15; Ms2Yah n = 12). Mice were group-housed (2-5 animals per cage) in the same conditions as described above.

Motor behavior assessment

Motor performance was tested in the rotarod and treadmill tests, to evaluate motor coordination and learning. In the rotarod, the ability of each mouse to maintain balance on a rotating rod (5 cm diameter and 10 cm long) with a plastic dowel surface was assessed with a commercially available rotarod (LE8500, Panlab-Harvard, SL, Spain), with fixed rotational speed (FRS) and acceleration. The experimental design consisted of two training trials at 4 rpm followed of consecutive 1 min trials at increasing FRS (4, 10, 14, 19, 24, and 34 rpm; inter-trial period 5 min); and one accelerating rod trial (4 to 40 rpm over 40-s). For each trial, the elapsed time until the mouse fell off the rod was recorded. The treadmill (Panlab-Harvard, SL, Spain) consisted of a belt (50 cm long and 20 cm wide) with adjustable speed (5 to 150 cm/s) and slope (0°–45°) and an electrified grid delivering a foot shock (0.6 mA) whenever the mice fell off the belt. Mice received eight 1 min trials on a single day session: two training trials (5 cm/s at 0°), and 6 test trials (5, 10, 20, 30, 40 and 50 cm/s at 20°). Number and duration of shocks were quantified.

Cognitive tests

In the novel object recognition task a 10 min habituation session was performed in an open field (OF; 70 cm x 70 cm) with two objects with the same preference levels. 24 h later, we performed a familiarization trial where mice were presented with a pair of identical objects

for a maximum of 10 min. Exploration of the objects is considered as any investigative behaviour (head orientation, or sniffing) or deliberate contact with each object in a distance $< \text{or} = 2 \text{ cm}$. Animals not exploring the objects during at least 20 s were discarded. In the test trial, 1h later, one of the familiar objects was changed for a new one, and the animals explored the OF during 5 min. Memory was operationally defined by the discrimination index (DI): time spent investigating the novel object minus the familiar one ($\text{DI} = (\text{Novel Object Exploration Time} / \text{Total Exploration Time}) - (\text{Familiar Object Exploration Time} / \text{Total Exploration Time}) \times 100$).

Animals were also tested in a visuo-spatial learning paradigm in the Morris Water Maze test (MWM) over 9 days (4 trials/session, 10-min inter-trial intervals). The water maze consisted of a circular pool (diameter, 1.50 m; height, 0.35 m) filled with tepid water (24°C) opacified with non-toxic white ink. A white escape platform (8 cm diameter, height 24 cm) was located 1 cm below the water surface in a fixed position (NE quadrant, 25 cm away from the wall). The maze was surrounded of white curtains with 3 black patterns affixed, to provide spatial cues. In a pre-training session the platform was visible in the center of the pool (day 1). In the five acquisition sessions (days 2-6) mice were introduced in the pool through different locations (N, S, E, W) and were allowed to swim until they located the platform. Mice failing to find the platform within 60 s were placed on it for 20 s. A probe trial (day 7), in which the platform was removed, was followed by a cued session (day 8) where the platform position was visible. Escape latencies, length of the swimming paths and swimming speed for each animal and trial were monitored and computed by a software tracking system SMART[®] (Panlab-Harvard, SL, Spain), connected to a video camera placed above the pool, and Jtrack, an in-house designed software (Arqué et al., 2008).

Finally in the cued fear-conditioning paradigm, each mouse was placed in a test chamber (67 cm x 53 cm x 55 cm) inside a sound-attenuated compartment (Panlab-Harvard, SL, Spain) with a weight transducer, two audio generators, an electrified grid and an incandescent light of 40W. In the conditioning session mice were allowed to explore freely the chamber for 2 min. Thereafter, an 8 kHz 100dB pure tone, which served as the conditioned stimulus (CS), was presented for 30 s, followed by a mild footshock (2 s, 0.2 mA), which served as the unconditioned stimulus (US). Fear testing was conducted 24 hr after conditioning during 2 min of free exploration and 3 min to exposure to the CS. Freezing time was recorded and analyzed.

Electrophysiology

The other type of experiment where we found interesting result in Ts1Yah was the electrophysiological activity of hippocampus neurons; changing was obviously expected in Ms2Yah correlatively with *Abcg1-U2af1* dosage diminution. Six months old control and mutant males (n = 10 per group) were anesthetized using 0.8-3% halothane delivered from a calibrated Fluotec 5 (Fluotec-Ohmeda, Tewksbury, MA) vaporizer, at a flow rate of 1-2 L/min oxygen. Animals were implanted with bipolar stimulating electrodes aimed at the right Schaffer collateral-commissural pathway of the dorsal hippocampus (2 mm lateral and 1.5 mm posterior to Bregma; depth from brain surface, 1.0-1.5 mm; Paxinos & Franklin, 2001) and with two recording electrodes aimed at the ipsilateral stratum radiatum underneath the CA1 area (1.2 mm lateral and 2.2 mm posterior to Bregma; depth from brain surface, 1.0-1.5 mm). These electrodes were made of 50 μ m, Teflon-coated tungsten wire (Advent Research Materials Ltd., Eynsham, England). The final position of hippocampal electrodes was determined using as a guide the field potential depth profile evoked by paired (40 ms interval) pulses presented at the Schaffer collateral pathway (Gruart, Munoz, & Delgado-

Garcia, 2006). A bare silver wire (0.1 mm) was affixed to the skull as a ground. The four wires were connected to a 4-pin socket and the socket was fixed to the skull with the help of two small screws and dental cement (see Gruart et al. (2006) for details).

Recording and stimulation procedures

Field excitatory post-synaptic potentials (fEPSPs) were recorded using Grass P511 differential amplifiers through a high-impedance probe ($2 \times 10^{12} \Omega$, 10 pF). Electrical stimulus presented to Schaffer collaterals consisted of 100 μ s, square, biphasic pulses presented alone, paired, or in trains. Stimulus intensities ranged from 0.02 to 500 μ A for the construction of the input/output curves. For paired pulse facilitation, the stimulus intensity was set well below the threshold for evoking a population spike, usually 35% of the intensity was necessary for evoking a maximum fEPSP response (Gureviciene et al., 2004). Paired pulses were presented at six (10, 20, 40, 100, 200, and 500) different pulse intervals. The stimulus intensity was also set at 35% of its asymptotic value for LTP induction. For LTP induction in alert behaving mice, the stimulus intensity was also set at 35% of its asymptotic value. An additional criterion for selecting stimulus intensity for LTP induction was that a second stimulus, presented 40 ms after a conditioning pulse, evoked a larger (> 20%) synaptic field potential than the first one (Bliss & Gardner-Medwin, 1973). Baseline records were collected for 15 min at a rate of 1 stimulus / 20 s. For LTP induction, each animal was presented with a high frequency stimulation (HFS) protocol consisting of five trains (200 Hz, 100 ms) of pulses at a rate of 1/s. This protocol was presented 6 times in total, at intervals of 1 min. The 100 μ s, square, biphasic pulses used to evoke LTP were applied at the same intensity used for baseline records. LTP evolution was followed for up to 48 h after HFS (Gruart et al., 2006).

Expression profiling analysis

Hippocampi were isolated from 3 months old male mice (n =5 per genotype) and flash frozen. Total RNA was prepared using RNeasy mini kit extraction (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. The quality of all RNA samples was controlled using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Total RNA was converted to cDNA using Superscript II (Invitrogen). Hybridization was carried out on Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST. Raw data of fluorescence were normalized with the Robust Multiarray Average (RMA) algorithm (Irizarry et al., 2003) and we calculated the fold change for the analysis. Hierarchical clustering was carried out with Cluster 3.0 software using Euclidian distances to calculate the distances between the genes and between the samples. Functional annotation was performed using Databases as the known mammalian phenotypes database available at the Mouse Genome Informatics. The microarray data were submitted to the Array Express Home under the accession number (E-MTAB-988). We used selection filters on the raw data provided by RMA algorithm to extract relevant differences between our 2 groups. We first excluded all probes expressed under a threshold of 4.36, eliminating about 30% of all the genes, considered as background noise. We ended up with 24,697 probes for which we normalized their expression value. We found 1586 probes misregulated with a fold change below 0.8 or above 1.2. The final data set contained 169 probes representing 74 identified genes that had a statistical significant fold change difference between wild type and Ms2Yah (Student t-test $p < 0.05$).

For the QRT-PCR experiments we considered 14 genes mapped on Mmu17, between the *Abcg1* and *U2af1* genes (mm9 database ENSEMBL); assays for the *Umodl1*, *Abcg1*, *U2af1* and *Cryaa* genes were also designed to check the expression of genes located at the borders of the interval. In addition, we included assays for 17 genes located outside the region of

interest. Among these, three genes for each tissue were selected for normalization and the remaining genes were used as additional controls. Selection of normalization genes was performed with GeNorm software (Vandesompele et al., 2002).

Statistical analysis

Results were processed for statistical analysis using the Sigma Plot software (Sigma) or the SPSS software unless otherwise indicated. Data are represented as the mean \pm S.E.M. All acquired behavioral data were analyzed using a one-way ANOVA test, with genotype as the independent variable. Data collected were also analyzed with general linear model with session as repeated measure. The electrophysiological experiments were analyzed using two-way repeated measures ANOVA. To assess the differences in gene expression values between monosomic and wild type samples, we performed the Test t de student with correction for multiple comparisons. Significance threshold was established at $p < 0.05$.

RESULTS

Motor behavior

To assess the motor learning and performance we compared 3-4 months old male Ms2Yah mice with their wild-type littermates using the rotarod and the treadmill paradigms. No significant differences between genotypes were detected in the rotarod test (Figure 1A). The latency to fall off the rod was similar both at constant speeds (4, 10, 14, 19, 24 and 34 rpm) but in the acceleration test (4-40 rpm in 40s) Ms2Yah showed a significantly higher latency to fall off the rod, indicating better performance ($p < 0.05$, Student's t test). However, in treadmill test, Ms2Yah mice received a higher number of shocks than wild-type mice in the last session (ANOVA $F_{(1,26)} = 4,980$ $p = 0,035$; Figure 1 B), suggesting a poorer performance on higher task demands.

Cognitive tests

We then investigated whether the decrease in copy number of the *Abcg1-U2af1* region have an impact on cognitive functions as observed for the Ts1Yah mice (Lopes Pereira et al., 2009). No differences were detected between genotypes in the object recognition test when analyzing the discrimination index (ANOVA $F_{(1,26)} = 0,015$ $p = 0,903$), nor in the Morris water maze, during the acquisition and cued sessions (Repeated Measures ANOVA $F_{(1,26)} = 0,070$ $p = 0,794$). Mice of both genotypes reached the platform with similar escape latencies (Repeated measures ANOVA $F_{(1,26)} = 0,010$ $p = 0,923$) and no differences were detected in swimming speed. No differences were observed in the preference for the trained quadrant in the removal session (ANOVA $F_{(1,26)} = 0,013$ $p = 0,909$), or in escape latency between genotypes in the reversal session (ANOVA $F_{(1,26)} = 0,040$ $p = 0,842$). However, in the fear-

conditioning test (Figure 2) we observed a longer freezing time in Ms2Yah mice (ANOVA $F_{(1,26)} = 2,963$ $p < 0,05$). The increase respect to the freezing in training session was significantly higher in Ms2Yah than in wild-type mice (Repeated measures $F_{(1,26)} = 5,680$ $p = 0,025$).

Input/output curves and paired-pulse facilitation

Overexpression of genes located in the *Abcg1-U2af1* region led to increase Long Term Potentiation (LTP) in the CA3-CA1 synapse of the hippocampus (Lopes Pereira et al., 2009), thus we explored the effect of the monosomy on this phenotype. In our current experiment, both wild-type and Ms2Yah mice presented similar increases in the slope of fEPSP evoked at the CA1 area following the presentation of singles pulses of increasing intensity at the ipsilateral Schaffer collaterals (Figure 3A). In all cases, these relationships were fitted by sigmoid curves ($r > 0.9$, $p < 0.0001$), suggesting a normal functioning of the CA3-CA1 synapse in the two genotypes.

As illustrated in Figure 3B, both wild-type and monosomic animals presented a significant (Repeated measures ANOVA $F_{(12,135)} = 56.126$, $p < 0.001$) increase of the response to the 2nd pulse at short (20-100 ms) time intervals. No significant differences between groups were observed at any of the selected (10, 20, 40, 100, 200, and 500 ms) intervals (Repeated measures ANOVA $F_{(12,135)} = 0.735$, $p = 0.540$) thus suggesting normal short term hippocampal plasticity.

Comparison of LTP evoked in alert behaving mice

For the LTP study, and in order to obtain a baseline, animals were stimulated every 20 s for ≥ 15 min at Schaffer collaterals (Figure 3C). After a stable baseline was obtained, the experimental animal was presented with the HFS protocol (see Methods). After HFS, the same single stimulus used to generate baseline records was presented at the initial rate (3/min) for another 30 min. Recording sessions were repeated 24 and 48 h later for 15 min each (Figure 3C). Using this HFS and recording protocols, both experimental groups presented a significant LTP for the first 24 h (Repeated measures ANOVA $p < 0.001$; $F_{(24,216)} = 10.785$), but with some interesting differences between them. Thus, the LTP response presented by Ms2Yah mice, was significantly larger than that presented by the wild-type group for most part of the recording period (Repeated measures ANOVA $p < 0.01$).

Molecular changes in the Ms2Yah hippocampus

To further characterize the impact of the *Abcg1-U2af1* monosomy, we carried out whole genome expression analysis on adult wt and Ms2Yah hippocampi using Affymetrix Gene Chip technology (Raveau, Lignon, Nalesso, Duchon, Groner, Sharp, Dembele, Brault, & Hérault, 2012). 24,697 transcripts were found expressed in the hippocampi over our threshold signal. After normalization, we only found a small subset of 1586 probes misregulated in the hippocampi with a fold change higher than 1.20 or lower than 0.80. Only 169 probes were statistically misexpressed with a P value lower than 0.05 (Table 1). Among them, 74 genes encoded proteins and 4 micro or non-coding RNAs. We also performed a cluster analysis and the result showed a clear discrimination between wt

and Ms2Yah samples with 2 groups of genes (Figure 4). The first group corresponds to 22 down-regulated genes, including *Cbs* located in the monosomic interval. The second group encompassed a series of 56 upregulated genes. Most of the genes were located outside the aneuploid regions, indicating a small genome-wide trans-effect on gene expression in the Ms2Yah adult hippocampi.

To further detail the expression profile, we performed a specific analysis for genes located in the monosomic interval. We used quantitative RT PCR on RNA isolated from monosomic hippocampi and their respective controls. All methods from RNA extraction to cDNA quantification have been already described elsewhere (Raveau, Lignon, Nalesso, Duchon, Groner, Sharp, Dembele, Brault, & Héroult, 2012). We focused on the *Abcg1-U2af1* genes plus genes located either at the borders, and a few genes among Mmu10 and 16 homologous regions (Figure 5). Most of genes from the monosomic interval appeared to be downregulated with a strong and significant decrease for *Cbs*, *Ndufv3*, *Wdr4* and *Pde9a* while the other neighboring and control genes were unchanged. These data highlighted the role of 4 genes from the monosomic region, which have potential impact on the cognitive function.

DISCUSSION

Partial deletions of 21q are rare and these patients display a highly variable phenotype depending on the size and position of the deletion. A review of the literature identified 38 cases with pure 21q deletions (Korbelt et al., 2009; Lindstrand et al., 2010; Lyle et al., 2009; Roberson et al., 2011). Partial monosomy 21 was recently segregated into three regions associated with variable clinical severity. Terminal deletions (21q22.2-ter and

21q22.3-ter), or interstitial hemizygous loss of 16.4 Mb (21q21.1-q22.11) gave rise to relatively mild phenotypes while other 21q deletions produce a greater number of dysmorphic features and some major malformations related to genes in the interval(Lindstrand et al., 2010; Roberson et al., 2011). The combined information of the 38 available cases suggests that the *ITSN1* gene is involved in severe mental retardation in patients with 21q deletion. In addition, a critical region of 0.56 Mb containing four genes, *KCNE1*, *DSCR1*, *CLIC6* and *RUNX1*, is associated with severe congenital heart defects, and deletion of the most proximal 15-17 Mb of 21q is associated with mild or no cognitive impairment, but may lead to problems with balance and motor function.

We have evaluated here the motor and cognitive, and hippocampal structural and electrophysiological phenotypes of a mouse model monosomic for the *Abcg1-U2af1* genetic interval. This model is suitable for evaluating the contribution to cognition not only of genes but also of other functional elements within this chromosomal region. Previous studies of mice trisomic for the same region (Ts1Yah) showed a complex cognitive phenotype that combined alteration in specific domains that are affected in well characterized Down syndrome (DS) models such as non-associative learning and short-term spatial and recognition memory (for review see Dierssen et al.(2009)). However, trisomy of the interval improved the performance in spatial learning, along with higher and longer-lasting LTP, thus suggesting improved hippocampal function. On this aspect, we concluded that, no matter the number of genes copies, the *Abcg1-U2af1* region is necessary to maintain normal LTP in hippocampus. Reference DS models such as Ts65Dn exhibit opposite phenotype with reduced LTP (A. C. S. Costa & Grybko, 2005; Siarey, Stoll, Rapoport, & Galdzicki, 1997), but this model does not involve our genetic interval so we can wonder how the contribution of the Mmu16 and Mmu17 trisomy will result in complete trisomy.

In the present experiments, Ms2Yah mice showed different phenotypes than Ts1Yah, with mild motor affectation, no spatial or recognition memory impairment, but improvement in fear associative memory. Hippocampal short-term plastic processes are not affected in Ms2Yah animals, since synaptic facilitation evoked by the presentation of a pair of pulses, a typical presynaptic short-term plastic property of the hippocampal CA3-CA1 synapse, which has been related to the process of neurotransmitter release was not affected in monosomic mice. At a behavioral level, paired-pulse facilitation of population spike is correlated with exploration of a new environment (Moser, 1996). The fact that exploration of novel objects did not lead to enhanced memory capabilities in Ms2Yah mice might be explained by their unchanged paired-pulse paradigm of population spike. However, similar to what was previously described in the homologous trisomy, Ms2Yah mice present larger and longer-lasting LTPs than their respective wild-type littermates. Correlations between learning capabilities and synaptic plasticity have been suggested for a long time and enhanced levels of LTP *in vivo* and of the freezing response in a contextual fear-conditioning task were reported (Sahún et al., 2007; Whitlock, Heynen, Shuler, & Bear, 2006a). In Ms2Yah there is however a dissociation of hippocampal function between spatial memory, novelty discrimination and fear memory, with a profile slightly different to that observed in Ts1Yah, suggesting that the reduced or increase expression levels of the same chromosomal region may lead to different phenotypic consequences.

The cellular and molecular approaches stressed changes in the Ms2Yah hippocampus that could contribute to changes in the synaptic connectivity and to the increased LTP. We found two groups of genes misregulated in the Ms2Yah hippocampi, the monosomy having a limited effect on the global transcriptome. We used softwares like Genespring© or Partek©, that pointed to a limited effect on the genetic expression induced by the small deletion. The

stringency and the power of the statistical tests did not unravel major genic change in regulation as observed in other models carrying larger aneuploidies (Braudeau, Dauphinot, et al., 2011; Raveau, Lignon, Nalesso, Duchon, Groner, Sharp, Dembele, Brault, & Hérault, 2012). Only 169 probes covering 74 genes encoded proteins, 4 non-coding RNAs and unknown products (Table 1) were statistically deregulated. Several upregulated genes are contributing to the postsynaptic membrane (*Park2*, *Dlg1*, *Grid2ip*, *Gabrr1*, *Gabrr2*), to regulate the Calcium/Calmodulin-dependent neuronal excitability or firing pattern (*Camk2d*, *Kcnn3*, *Cacna1g*, *S100a10*). We found misexpression of *Huwe1*, *Anapc1*, *Spsb3*, *Rnf7*, *Uevld* and *Ups54*. These 6 genes encode products linked to the ubiquitination pathway and the degradation of target proteins. Their abnormal expression might impede cell cycle progression, signal transduction and transcription during neural differentiation. Interestingly we found downregulation of *Sox2*, and overexpression of *Kitl* and *Cit*, that are known to control the differentiation of neural stem cells (Ahmed, Douglas, Read, Berry, & Logan, 2011; Anastas, Mueller, Semple-Rowland, Breunig, & Sarkisian, 2011; Das, James, Zhao, Rahnenführer, & Ahmad, 2004; Episkopou, 2005; Ferri et al., 2004; Jin, Mao, Sun, Xie, & Greenberg, 2002; Miyagi et al., 2008; Nicodemus et al., 2010). Similarly *Claudin5* (*Cldn5*) playing a role in tight junction is downregulated as well as *Cbs*, whose deficiency causes human homocystinuria (OMIN 236200).

The examination of genes from the *Abcg1-U2af1* region highlighted 4 genes, *Pde9a*, *Cbs*, *Ndufv3* and *Wdr4* known to be involved in cognitive function. *Pde9a* encodes a phosphodiesterase specifically expressed in the hippocampus, whose inhibition increases early and late LTP (Kroger et al., 2012). *Pde9a* plays a role in synaptic activities through a regulation of cGMP pathway (Bales et al., 2010). Our monosomic model, with a loss of one copy and a consequent reduced expression of *Pde9a*, is comparable to an inhibition

model, and thus, the LTP enhancement observed may be dependent on *Pde9a* hemizyosity. Finally, *Cbs* is an interesting candidate, recently shown to induce increase in *in vitro* LTP in gain of function experiment (Régnier et al., 2012). However, since Ms2Yah has reduced expression of *Cbs*, this candidate could explain better the increased LTP observed in Ts1Yah, thus suggesting that even though the same chromosomal region is deregulated in both models, different genes could contribute to giving rise to similar phenotypes.

The modifications of cognitive and electrophysiological responses described in this report pinpoint to the role of the *Abcg1-U2af1* genetic interval in the control of brain functions. Taken into account the similarities and differences to those found in the trisomy for the same chromosomal region (Lopes Pereira et al., 2009), they reinforce the hypothesis of the presence of key dosage sensitive gene(s) regulating neuronal response. Obviously, *Cbs*, *Ndufv3*, *Wdr4* and *Pde9a* are good candidates and it would be of particular interest to evaluate their interaction in the context of DS, with genes found in other regions homologous to HSA21. The *Abcg1-U2af1* interval may modify specific phenotypes of trisomic models by reducing functional dosage in larger trisomy such as the Tc1 model (O'Doherty et al., 2005a). By using such approaches we will certainly identify key genes and pathways regulating cognitive phenotypes that are interfering in Down syndrome patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank members of the research group, of the IGBMC laboratory, of the ICS and of the AnEUploidy consortium for their helpful comments (www.aneuploidy.org). We are grateful to the animal care-takers of the CNRS UPS44 TAAM unit and of the ICS. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The project was supported by the French National Centre for Scientific Research (CNRS), the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM), the University of Strasbourg and the “Centre Europeen de Recherche en Biomedecine”, the “Fondation Jerome Lejeune” and the European commission with the AnEUploidy project (LSHG-CT-2006-037627) to YH; and DURSI (2009SGR1313) Spanish Ministry of Economy and Innovation (SAF2010-16427), FIS (PI082038), Marató TV3, Jerome Lejeune, and Areces Foundations and EU (LSHG-CT-2006-037627; CureFXS ERare-EU/FIS PS09102673) to MD. The CIBER of Enfermedades Raras is an initiative of the ISCIII.

REFERENCES

- Ahmed, Z., Douglas, M.R., Read, M.L., Berry, M., Logan, A., 2011. Citron kinase regulates axon growth through a pathway that converges on cofilin downstream of RhoA. *Neurobiol Dis.* 41, 421-9.
- Anastas, S.B., Mueller, D., Semple-Rowland, S.L., Breunig, J.J., Sarkisian, M.R., 2011. Failed cytokinesis of neural progenitors in citron kinase-deficient rats leads to multiciliated neurons. *Cereb Cortex.* 21, 338-44.
- Arqué, G., Fotaki, V., Fernández, D., Martínez de Lagrán, M., Arbonés, M., Dierssen, M., 2008. Impaired spatial learning strategies and novel object recognition in mice haploinsufficient for the dual specificity tyrosine-regulated kinase-1A (Dyrk1A). *PLoS One.* 3, e2575.
- Bales, K.R., Plath, N., Svenstrup, N., Menniti, F.S., 2010. Phosphodiesterase Inhibition to Target the Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Neurodegenerative Diseases.* 6, 57-90.
- Braudeau, J., Dauphinot, L., Duchon, A., Loistron, A., Dodd, R.H., Héroult, Y., Delatour, B., Potier, M.C., 2011. Chronic Treatment with a Promnesiant GABA-A $\alpha 5$ -Selective Inverse Agonist Increases Immediate Early Genes Expression during Memory Processing in Mice and Rectifies Their Expression Levels in a Down Syndrome Mouse Model. *Adv Pharmacol Sci.* 2011, 153218.
- Costa, A.C.S., Grybko, M.J., 2005. Deficits in hippocampal CA1 LTP induced by TBS but not HFS in the Ts65Dn mouse: A model of Down syndrome. *Neuroscience Letters.* 382, 317-322.
- Das, A.V., James, J., Zhao, X., Rahnenführer, J., Ahmad, I., 2004. Identification of c-Kit receptor as a regulator of adult neural stem cells in the mammalian eye: interactions with Notch signaling. *Dev Biol.* 273, 87-105.
- Dierssen, M., Héroult, Y., Estivill, X., 2009. Aneuploidy: from a physiological mechanism of variance to Down syndrome. *Physiol Rev.* 89, 887-920.
- Duchon, A., Pothion, S., Brault, V., Sharp, A.J., Tybulewicz, V.L.J., Fisher, E.M.C., Héroult, Y., 2011. The telomeric part of the human chromosome 21 from Cstb to Prmt2 is not necessary for the locomotor and short-term memory deficits observed in the Tc1 mouse model of Down syndrome. *Behavioural Brain Research.* 217, 271-281.
- Episkopou, V., 2005. SOX2 functions in adult neural stem cells. *Trends Neurosci.* 28, 219-21.
- Ferri, A.L., Cavallaro, M., Braidà, D., Di Cristofano, A., Canta, A., Vezzani, A., Ottolenghi, S., Pandolfi, P.P., Sala, M., DeBiasi, S., Nicolis, S.K., 2004. Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development.* 131, 3805-19.

- Gruart, A., Munoz, M.D., Delgado-Garcia, J.M., 2006. Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *Journal of Neuroscience*. 26, 1077-1087.
- Guedj, F., Pereira, P.L., Najas, S., Barallobre, M.J., Chabert, C., Souchet, B., Sebrie, C., Verney, C., Herault, Y., Arbones, M., Delabar, J.M., 2012. DYRK1A: a master regulatory protein controlling brain growth. *Neurobiol Dis*. 46, 190-203.
- Gureviciene, I., Ikonen, S., Gurevicius, K., Sarkaki, A., van Groen, T., Pussinen, R., Ylinen, A., Tanila, H., 2004. Normal induction but accelerated decay of LTP in APP+PS1 transgenic mice. *Neurobiology of Disease*. 15, 188-195.
- Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U., Speed, T.P., 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 4, 249-264.
- Jin, K., Mao, X.O., Sun, Y., Xie, L., Greenberg, D.A., 2002. Stem cell factor stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. 110, 311-9.
- Korbel, J.O., Tirosh-Wagner, T., Urban, A.E., Chen, X.N., Kasowski, M., Dai, L., Grubert, F., Erdman, C., Gao, M.C., Lange, K., Sobel, E.M., Barlow, G.M., Aylsworth, A.S., Carpenter, N.J., Clark, R.D., Cohen, M.Y., Doran, E., Falik-Zaccai, T., Lewin, S.O., Lott, I.T., McGillivray, B.C., Moeschler, J.B., Pettenati, M.J., Puschel, S.M., Rao, K.W., Shaffer, L.G., Shohat, M., Van Riper, A.J., Warburton, D., Weissman, S., Gerstein, M.B., Snyder, M., Korenberg, J.R., 2009. The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106, 12031-12036.
- Kroker, K.S., Rast, G., Giovannini, R., Marti, A., Dorner-Ciossek, C., Rosenbrock, H., 2012. Inhibition of acetylcholinesterase and phosphodiesterase-9A has differential effects on hippocampal early and late LTP. *Neuropharmacology*. 62, 1964-1974.
- Lindstrand, A., Malmgren, H., Sahlén, S., Schoumans, J., Nordgren, A., Ergander, U., Holm, E., Anderlid, B.M., Blennow, E., 2010. Detailed molecular and clinical characterization of three patients with 21q deletions. *Clin Genet*. 77, 145-54.
- Lopes Pereira, P., Magnol, L., Sahún, I., Brault, V., Duchon, A., Prandini, P., Gruart, A., Bizot, J., Chadeaux-Vekemans, B., Deutsch, S., Trovero, F., Delgado-García, J., Antonarakis, S., Dierssen, M., Herault, Y., 2009. A new mouse model for the trisomy of the Abcg1-U2af1 region reveals the complexity of the combinatorial genetic code of down syndrome. *Hum Mol Genet*. 18, 4756-69.
- Lyle, R., Bena, F., Gagos, S., Gehrig, C., Lopez, G., Schinzel, A., Lespinasse, J., Bottani, A., Dahoun, S., Taine, L., Doco-Fenzy, M., Cornillet-Lefebvre, P., Pelet, A., Lyonnet, S., Toutain, A., Colleaux, L., Horst, J., Kennerknecht, I., Wakamatsu, N., Descartes, M., Franklin, J.C., Florentin-Arar, L., Kitsiou, S., Yahya-Graison, E.A., Costantine, M., Sinet, P.M., Delabar, J.M., Antonarakis, S.E., 2009. Genotype-phenotype correlations

- in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. *European Journal of Human Genetics*. 17, 454-466.
- Miyagi, S., Masui, S., Niwa, H., Saito, T., Shimazaki, T., Okano, H., Nishimoto, M., Muramatsu, M., Iwama, A., Okuda, A., 2008. Consequence of the loss of Sox2 in the developing brain of the mouse. *FEBS Lett*. 582, 2811-5.
- Moser, E.I., 1996. Altered inhibition of dentate granule cells during spatial learning in an exploration task. *J Neurosci*. 16, 1247-59.
- Nicodemus, K.K., Callicott, J.H., Higier, R.G., Luna, A., Nixon, D.C., Lipska, B.K., Vakkalanka, R., Giegling, I., Rujescu, D., St Clair, D., Muglia, P., Shugart, Y.Y., Weinberger, D.R., 2010. Evidence of statistical epistasis between DISC1, CIT and NDEL1 impacting risk for schizophrenia: biological validation with functional neuroimaging. *Hum Genet*. 127, 441-52.
- O'Doherty, A., Ruf, S., Mulligan, C., Hildreth, V., Errington, M.L., Cooke, S., Sesay, A., Modino, S., Vanes, L., Hernandez, D., Linehan, J.M., Sharpe, P.T., Brandner, S., Bliss, T.V., Henderson, D.J., Nizetic, D., Tybulewicz, V.L., Fisher, E.M., 2005. An aneuploid mouse strain carrying human chromosome 21 with Down syndrome phenotypes. *Science*. 309, 2033-7.
- Raveau, M., Lignon, J.M., Nalesso, V., Duchon, A., Groner, Y., Sharp, A.J., Dembele, D., Brault, V., Héroult, Y., 2012. The app-runx1 region is critical for birth defects and electrocardiographic dysfunctions observed in a down syndrome mouse model. *PLoS Genet*. 8, e1002724.
- Reeves, R.H., Irving, N.G., Moran, T.H., Wohn, A., Kitt, C., Sisodia, S.S., Schmidt, C., Bronson, R.T., Davisson, M.T., 1995. A MOUSE MODEL FOR DOWN-SYNDROME EXHIBITS LEARNING AND BEHAVIOR DEFICITS. *Nature Genetics*. 11, 177-184.
- Roberson, E.D., Wohler, E.S., Hoover-Fong, J.E., Lisi, E., Stevens, E.L., Thomas, G.H., Leonard, J., Hamosh, A., Pevsner, J., 2011. Genomic analysis of partial 21q monosomies with variable phenotypes. *Eur J Hum Genet*. 19, 235-8.
- Régnier, V., Billard, J.M., Gupta, S., Potier, B., Woerner, S., Paly, E., Ledru, A., David, S., Luilier, S., Bizot, J.C., Vacano, G., Kraus, J.P., Patterson, D., Kruger, W.D., Delabar, J.M., London, J., 2012. Brain phenotype of transgenic mice overexpressing cystathionine β -synthase. *PLoS One*. 7, e29056.
- Sahún, I., Delgado-García, J.M., Amador-Arjona, A., Giralt, A., Alberch, J., Dierssen, M., Gruart, A., 2007. Dissociation between CA3-CA1 synaptic plasticity and associative learning in TgNTRK3 transgenic mice. *J Neurosci*. 27, 2253-60.
- Siarey, R.J., Stoll, J., Rapoport, S.I., Galdzicki, Z., 1997. Altered long-term potentiation in the young and old Ts65Dn mouse, a model for Down Syndrome. *Neuropharmacology*. 36, 1549-1554.

- Umlauf, D., Fraser, P., Nagano, T., 2008. The role of long non-coding RNAs in chromatin structure and gene regulation: variations on a theme. *Biological Chemistry*. 389, 323-331.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 3.
- Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G., Bear, M.F., 2006. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*. 313, 1093-7.
- Yu, T., Li, Z.Y., Jia, Z.P., Clapcote, S.J., Liu, C.H., Li, S.M., Asrar, S., Pao, A., Chen, R.Q., Fan, N., Carattini-Rivera, S., Bechard, A.R., Spring, S.S., Henkelman, R.M., Stoica, G., Matsui, S.I., Nowak, N.J., Roder, J.C., Chen, C., Bradley, A., Yu, Y.E., 2010a. A mouse model of Down syndrome trisomic for all human chromosome 21 syntenic regions. *Human Molecular Genetics*. 19, 2780-2791.
- Yu, T., Liu, C.H., Belichenko, P., Clapcote, S.J., Li, S.M., Pao, A.N., Kleschevnikov, A., Bechard, A.R., Asrar, S., Chen, R.Q., Fan, N., Zhou, Z.Y., Jia, Z.P., Chen, C., Roder, J.C., Liu, B., Baldini, A., Mobley, W.C., Yu, Y.E., 2010b. Effects of individual segmental trisomies of human chromosome 21 syntenic regions on hippocampal long-term potentiation and cognitive behaviors in mice. *Brain Research*. 1366, 162-171.

TABLE

| Gp | Probe ID | Gene Symbol | Chr | wtmean±sem | Ms2Yah mean±sem | Fold change Ms/wt | test pot hoc |
|----|----------|----------------------|-----|------------|--------------------|-------------------------|-----------------|
| 1 | 10434229 | <i>Cldn5</i> | 16 | 0,77±0,15 | 0,52±0,09 | 0,68 | * |
| 1 | 10449712 | <i>Cbs</i> | 17 | 0,9±0,12 | 0,62±0,05 | 0,69 | * |
| 1 | 10341078 | <i>Tmem234</i> | 4 | 0,84±0,1 | 0,63±0,07 | 0,75 | * |
| 1 | 10442580 | <i>Rps2</i> | 17 | 0,98±0,08 | 0,74±0,07 | 0,76 | * |
| 1 | 10536949 | <i>Fam40b</i> | 6 | 0,95±0,06 | 0,72±0,08 | 0,76 | * |
| 1 | 10505954 | <i>Tek</i> | 4 | 0,85±0,1 | 0,66±0,14 | 0,77 | ** |
| 1 | 10539119 | <i>Ggcx</i> | 6 | 0,99±0,04 | 0,76±0,09 | 0,77 | * |
| 1 | 10491477 | <i>Sox2</i> | 3 | 0,86±0,11 | 0,67±0,15 | 0,78 | * |
| 1 | 10404059 | <i>Hist1h1c</i> | 13 | 1,05±0,15 | 0,82±0,08 | 0,78 | * |
| 1 | 10584712 | <i>Hyou1</i> | 9 | 0,89±0,08 | 0,69±0,09 | 0,78 | * |
| 1 | 10343064 | <i>Copg</i> | 6 | 0,9±0,07 | 0,7±0,08 | 0,78 | ** |
| 1 | 10542596 | <i>Slcol1c1</i> | 6 | 0,95±0,1 | 0,74±0,12 | 0,79 | * |
| 1 | 10514558 | <i>Gm12696</i> | 4 | 0,71±0,13 | 0,56±0,12 | 0,79 | * |
| 1 | 10603870 | <i>Elk1</i> | X | 0,9±0,08 | 0,71±0,06 | 0,79 | * |
| 1 | 10346840 | <i>Gm11599</i> | 1 | 1,02±0,07 | 0,8±0,06 | 0,79 | * |
| 1 | 10442629 | <i>Spsb3</i> | 17 | 0,93±0,04 | 0,73±0,09 | 0,79 | * |
| 1 | 10470948 | <i>Slc39a1</i> | 3 | 1,04±0,09 | 0,82±0,15 | 0,79 | * |
| 1 | 10525726 | <i>2810006K23Rik</i> | 5 | 0,92±0,06 | 0,73±0,1 | 0,79 | * |
| 1 | 10339957 | <i>Tbl3</i> | 17 | 1,07±0,12 | 0,85±0,07 | 0,79 | * |
| 1 | 10363170 | <i>Msl3l2</i> | 10 | 0,96±0,04 | 0,76±0,12 | 0,80 | * |
| 1 | 10544171 | <i>Slc37a3</i> | 6 | 0,88±0,05 | 0,7±0,12 | 0,80 | * |
| 1 | 10539592 | <i>Smyd5</i> | 6 | 0,93±0,09 | 0,74±0,09 | 0,80 | * |
| 1 | 10358670 | <i>Hmcn1</i> | 1 | 0,87±0,08 | 0,7±0,09 | 0,80 | *** |
| 2 | 10338493 | <i>Dlg1</i> | 16 | 0,87±0,08 | 1,04±0,1 | 1,20 | * |
| 2 | 10493555 | <i>Kcnn3</i> | 3 | 1,04±0,05 | 1,25±0,13 | 1,20 | * |
| 2 | 10498403 | <i>B430305J03Rik</i> | 3 | 1,08±0,07 | 1,29±0,1 | 1,20 | * |
| 2 | 10503259 | <i>Trp53inp1</i> | 4 | 1,12±0,13 | 1,35±0,15 | 1,20 | * |
| 2 | 10601044 | <i>Gdpd2</i> | X | 0,95±0,04 | 1,14±0,07 | 1,21 | * |
| 2 | 10503856 | <i>Gabrr2</i> | 4 | 1,28±0,13 | 1,55±0,09 | 1,21 | * |
| 2 | 10606595 | <i>Gm7820</i> | X | 1,09±0,04 | 1,31±0,12 | 1,21 | * |
| 2 | 10366052 | <i>Kitl</i> | 10 | 0,88±0,07 | 1,06±0,08 | 1,21 | * |
| 2 | 10426581 | <i>AI836003</i> | 15 | 1,05±0,03 | 1,26±0,1 | 1,21 | * |
| 2 | 10540533 | <i>Cav3</i> | 6 | 0,97±0,04 | 1,17±0,1 | 1,21 | * |
| 2 | 10493995 | <i>S100a10</i> | 3 | 0,91±0,07 | 1,1±0,1 | 1,21 | * |
| 2 | 10600031 | <i>Atp6v0e</i> | X | 1,08±0,15 | 1,31±0,03 | 1,21 | * |
| 2 | 10603099 | <i>Figf</i> | X | 0,93±0,15 | 1,13±0,12 | 1,22 | * |
| 2 | 10441933 | <i>C6orf70</i> | 17 | 0,98±0,07 | 1,2±0,13 | 1,23 | * |
| 2 | 10423953 | <i>Trhr</i> | 15 | 0,66±0,14 | 0,81±0,09 | 1,23 | * |
| 2 | 10606989 | <i>Tsc22d3</i> | X | 1,23±0,26 | 1,52±0,19 | 1,23 | * |
| 2 | 10543249 | <i>Gm4876</i> | 6 | 0,91±0,09 | 1,12±0,11 | 1,24 | * |
| 2 | 10579406 | <i>Arrdc2</i> | 8 | 1,19±0,11 | 1,47±0,21 | 1,24 | * |
| 2 | 10338254 | <i>Cpsf7</i> | 19 | 0,85±0,11 | 1,06±0,07 | 1,24 | * |
| 2 | 10540333 | <i>Cntn6</i> | 6 | 0,92±0,08 | 1,14±0,13 | 1,24 | * |

| | | | | | | | |
|---|----------|----------------------|----|-----------|-----------|------|----|
| 2 | 10500837 | <i>Dclre1b</i> | 3 | 1,05±0,07 | 1,31±0,16 | 1,25 | ** |
| 2 | 10389929 | <i>Cacna1g</i> | 11 | 0,92±0,06 | 1,16±0,14 | 1,26 | * |
| 2 | 10344289 | <i>Huwe1</i> | X | 1,1±0,11 | 1,39±0,13 | 1,26 | * |
| 2 | 10604175 | <i>Fam70a</i> | X | 0,92±0,09 | 1,16±0,12 | 1,26 | * |
| 2 | 10500272 | <i>Gm129</i> | 3 | 1,12±0,26 | 1,41±0,24 | 1,26 | * |
| 2 | 10503866 | <i>Gabrr1</i> | 4 | 1,03±0,05 | 1,31±0,05 | 1,27 | ** |
| 2 | 10564237 | <i>Gm9801</i> | 7 | 0,95±0,08 | 1,21±0,14 | 1,27 | * |
| 2 | 10438555 | <i>Thpo</i> | 16 | 1,03±0,1 | 1,31±0,1 | 1,27 | * |
| 2 | 10441718 | <i>Park2</i> | 17 | 1,21±0,14 | 1,55±0,08 | 1,28 | ** |
| 2 | 10497912 | <i>Gm5148</i> | 3 | 0,96±0,08 | 1,22±0,13 | 1,28 | * |
| 2 | 10595803 | <i>Rnf7</i> | 9 | 0,96±0,04 | 1,23±0,13 | 1,28 | * |
| 2 | 10436449 | <i>mIRALC154309</i> | 16 | 0,87±0,09 | 1,12±0,03 | 1,28 | * |
| 2 | 10476395 | <i>Bmp2</i> | 2 | 0,99±0,06 | 1,26±0,17 | 1,28 | * |
| 2 | 10524790 | <i>Cit</i> | 5 | 0,92±0,06 | 1,18±0,09 | 1,28 | * |
| 2 | 10563649 | <i>Uevld</i> | 7 | 0,86±0,07 | 1,11±0,14 | 1,28 | * |
| 2 | 10417912 | <i>Usp54</i> | 14 | 1,12±0,09 | 1,44±0,25 | 1,29 | * |
| 2 | 10525553 | <i>Rnu1b1</i> | 3 | 1,01±0,02 | 1,31±0,09 | 1,29 | ** |
| 2 | 10590433 | <i>1700048O20Rik</i> | 9 | 1,07±0,03 | 1,39±0,13 | 1,29 | * |
| 2 | 10340368 | <i>Brunol5</i> | 4 | 1±0,11 | 1,3±0,15 | 1,30 | * |
| 2 | 10496872 | <i>Eltf1</i> | 3 | 1,08±0,12 | 1,42±0,31 | 1,32 | * |
| 2 | 10437590 | <i>Carhsp1</i> | 16 | 1,06±0,09 | 1,4±0,17 | 1,32 | * |
| 2 | 10340952 | <i>Dhrs1</i> | 14 | 0,98±0,12 | 1,31±0,14 | 1,33 | * |
| 2 | 10353010 | <i>Mybl1</i> | 1 | 1,07±0,11 | 1,44±0,22 | 1,35 | * |
| 2 | 10567518 | <i>Dnahc3</i> | 7 | 0,98±0,07 | 1,33±0,25 | 1,36 | * |
| 2 | 10447617 | <i>Mir692-1</i> | 17 | 0,8±0,14 | 1,09±0,11 | 1,36 | * |
| 2 | 10550627 | <i>Gpr4</i> | 7 | 0,89±0,09 | 1,22±0,14 | 1,37 | * |
| 2 | 10344426 | <i>mIRAL589870</i> | UN | 1,08±0,13 | 1,49±0,16 | 1,37 | ** |
| 2 | 10397853 | <i>Rin3</i> | 12 | 1,06±0,04 | 1,48±0,25 | 1,39 | * |
| 2 | 10495896 | <i>Camk2d</i> | 3 | 0,97±0,06 | 1,36±0,2 | 1,40 | * |
| 2 | 10608711 | <i>Erdr1</i> | UN | 1,13±0,14 | 1,59±0,07 | 1,41 | * |
| 2 | 10527186 | <i>Grid2ip</i> | 5 | 0,84±0,08 | 1,19±0,1 | 1,41 | * |
| 2 | 10583316 | <i>Taf1d</i> | 9 | 1,09±0,17 | 1,56±0,1 | 1,43 | ** |
| 2 | 10598203 | <i>Ccl28</i> | UN | 0,81±0,19 | 1,16±0,1 | 1,44 | * |
| 2 | 10562576 | <i>Plekhf1</i> | 7 | 1,39±0,25 | 2,05±0,32 | 1,47 | ** |
| 2 | 10398326 | <i>Meg3</i> | 12 | 0,85±0,17 | 1,25±0,15 | 1,48 | * |
| 2 | 10442231 | <i>3110052M02Rik</i> | 17 | 1,05±0,16 | 1,59±0,04 | 1,52 | ** |

Table 1: Genes deregulated in the Ms2Yah mice hippocampi. Only the genes up- or down-regulated for which the statistical test is below 0.05 are listed here. “Gp” means group of down- (1) or up- (2) regulated; “Chr” to indicate chromosome gene’s location and FC for Fold change. The post hoc test used is a bilateral Student t-test (p values: *** p<0.001; ** p<0.01; * p<0.05).

FIGURES LEGENDS

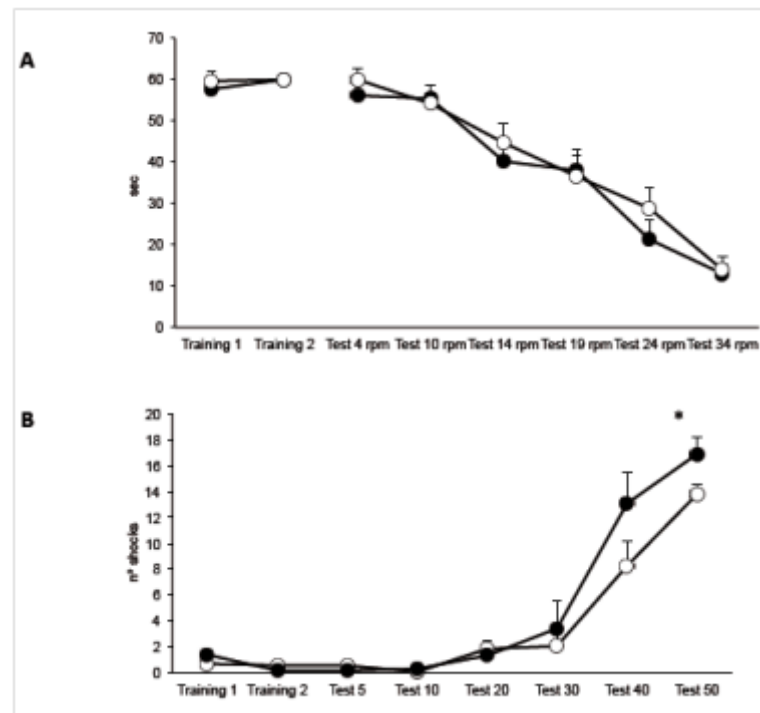


Figure 1. Motor assessment of Ms2Yah monosomic model for the *Abcg1-U2af1* region

Motor performance of Ms2Yah (black circles; n = 12) and wild-type male mice (white circles; n = 15) was assessed in the rotarod (A) and treadmill (B) tests. (A) Mean \pm S.E.M. of the latencies to fall off the rotarod during training sessions (Training 1 and Training 2) and along test sessions with increasing fixed rotational speeds (4, 10, 14, 19, 24, and 34 rpm) in the rotarod, (B) In the first two trials (Training 1 and 2) of the treadmill, the belt speed was set at 5 cm/s with a slope of 0°. In the following trials (test), the slope was increased from 0° to 20°, with increasing speed (5, 10, 20, 30, 40 and 50 cm/s). Ms2Yah mice did not show any significant motor coordination or motor learning impairment except in very highly demanding conditions (last session of the treadmill; * p < 0.05).

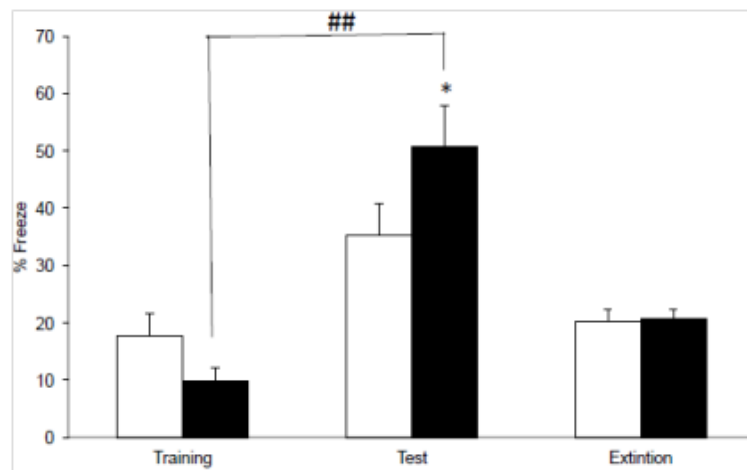


Figure 2. Cognitive assessment of Ms2Yah monosomic model for the *Abcg1-U2af1* region

Long-term memory (LTM) of cued fear-conditioning in Ms2Yah (Black bars) and wild-type mice (White bars). Mice (n= 12–15/group) underwent a single training and LTM was determined 24 h. Results are expressed as percent of total time spent freezing. Pretraining measurements reflect immobility before the footshock; no differences in % freezing between the groups were observed in baseline activity during the pretraining period. Ms2Yah mice froze significantly more to the context than wild-type mice indicating that they acquired more efficiently cued LTM, Values are given as means \pm SEM. (*) Significantly different from wild-type ($p < 0.05$). (##) Significantly different from training session ($p < 0.01$).

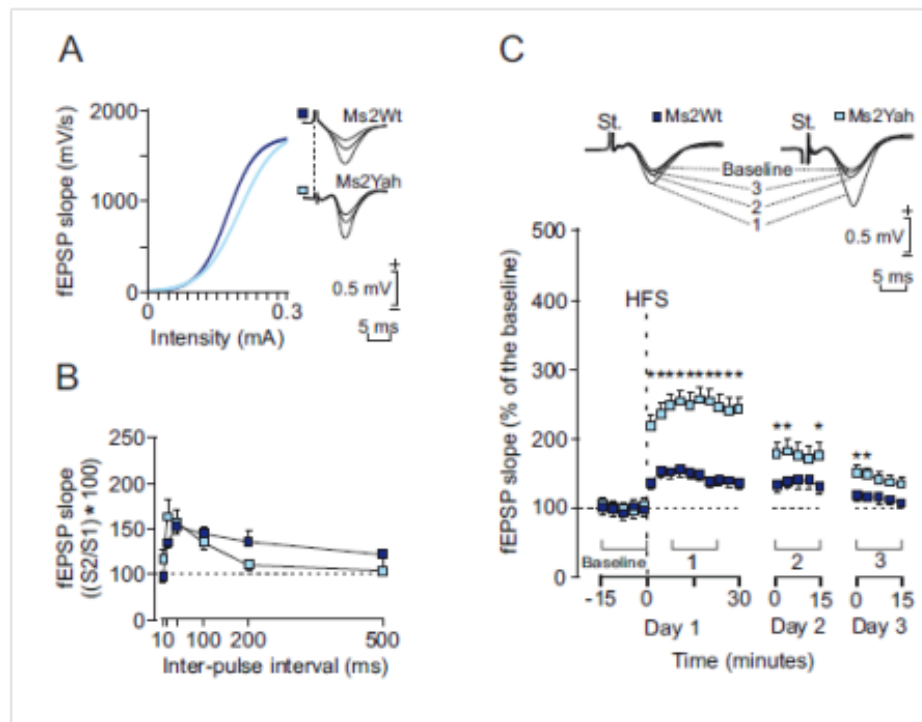


Figure 3. Changes in Long Term Potentiation in Ms2Yah mice compared to wild-type littermates.

Ms2Yah mice presented normal input/output curves and paired pulse facilitation, but a larger LTP induction of fEPSPs recorded in the CA1 area following stimulation of Schaffer collaterals. (A) Input/output curves for the CA3-CA1 synapse. A single (100 μ s, biphasic) pulse was presented to Schaffer collaterals at increasing intensities (in mA) while recording the evoked fEPSP at the CA1 area for wild-type (Ms2Wt, gray squares) and transgenic (Ms2Ysh, black squares) Ms2 mice. Some fEPSPs collected from the two types of mouse are illustrated at the right. (B) Paired-pulse facilitation. The data shown are mean \pm SEM slopes of the second fEPSP expressed as a percentage of the first for six (10, 20, 40, 100, 200, 500) interstimulus intervals. The two groups of mice presented similar paired-pulse facilitation at intervals of 20-100 ms. (C) The upper panel illustrates examples of fEPSPs collected from selected Ms2Wt (gray square) and Ms2Yah (black square) animals before (baseline) and after (days 1-3) high-frequency stimulation (HFS) of Schaffer collaterals. The bottom graph

illustrates the time course of LTP evoked in the CA1 area (fEPSP mean \pm SEM) following HFS for Ms2Wt and Ms2Yah mice. The HFS was presented after 15 min of baseline recordings, at the time marked by the dashed line. The fEPSP is given as a percentage of the baseline (100%) slope. Although the two groups presented a significant increase (ANOVA, two-tailed) in fEPSP slope following HFS when compared with baseline records, values collected from the MS2Yah group were significantly (* $P < 0.01$; $F_{(24,216)} = 10.785$) larger than those collected from Ms2Wt mice at the indicated times.

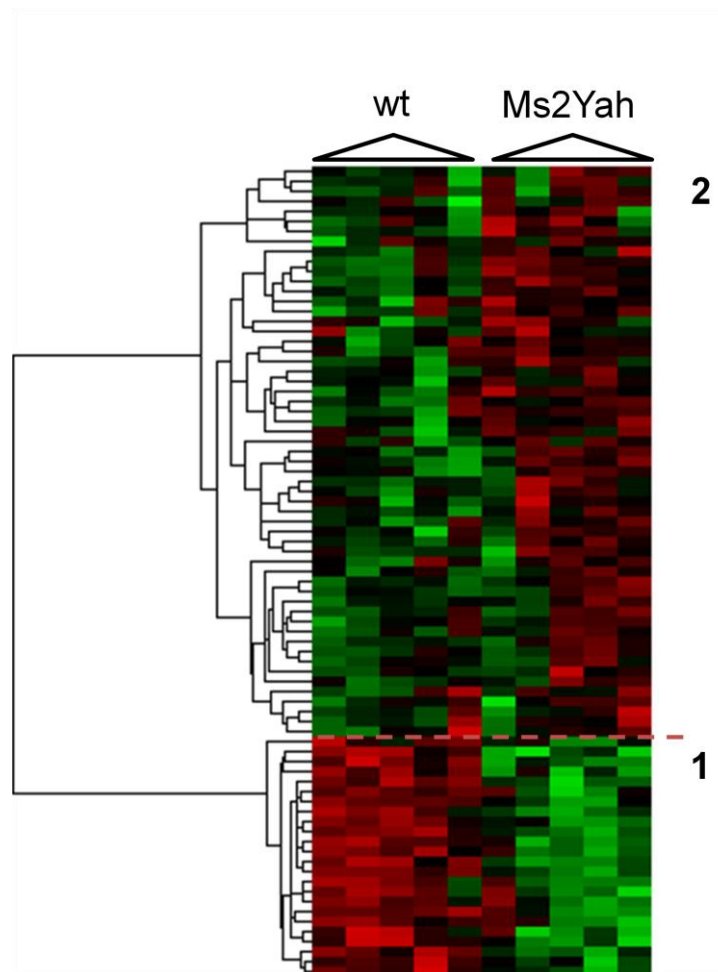


Figure 4. Clustering derived from statistically deregulated genes in Ms2Yah hippocampi.

Whole genome microarray expression analysis was performed on RNA isolated from whole adult mouse hippocampi and statistically deregulated genes were assessed using GeneSpring software. Under-expression and over-expression are represented in green and red

respectively, expression levels were calculated by comparison to mean expression level of all arrays for each gene. All the selected genes were selected through significant differences ($p < 0.05$) and with an up/down cut off on the fold change ($0,8 < x$ for the group 1 and $x > 1,2$ for the group 2).

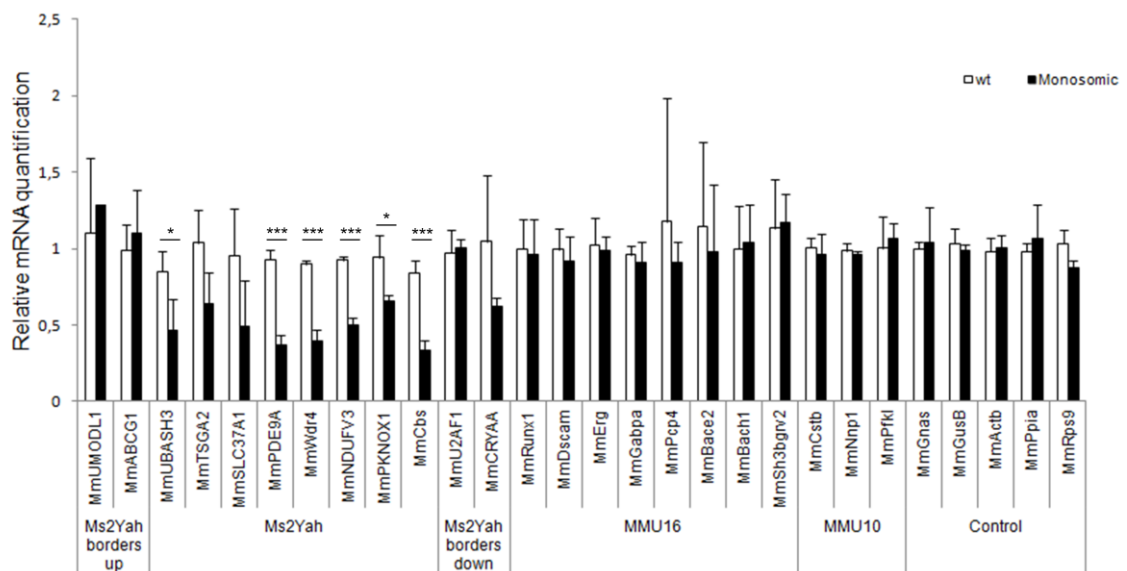


Figure 5. Quantitative PCR expression study focusing on genes located in the *Abcg16U2af1* regions and on genes homologous to *HSA21* located in additional genetic interval. We tested *Ms2Yah* region genes, borders and relevant genes on the mouse chromosome 10 and 16. Those results confirmed the transcriptome analysis showing underexpressed genes from the *Abcg1-U2af1* region compared to all the other genes tested.

DISCUSSION

Le point commun à tous les projets décrits dans ce manuscrit est la région génétique *Abcg1-U2af1*, très peu étudiée dans la trisomie 21. Elle correspond à la plus petite région de syntenie avec la souris, située sur le chromosome 17 murin. Les différentes approches appliquées à nos nombreux modèles murins ont montré que le déséquilibre du nombre de copies de cet intervalle impactait diverses fonctions biologiques, touchées elles aussi dans la symptomatologie du syndrome de Down, à savoir la locomotion et les capacités cognitives. Nous avons observé les effets engendrés par différentes doses de cet intervalle génétique, avec pour base la nécessité vitale d'une copie minimum, la nullisomie étant létale. Le principal gène responsable de cette létalité serait le gène *Pknox1* important dans le développement embryonnaire (E. Ferretti et al., 2006).

I. Effet de dose de la région *Abcg1-U2af1* sur la locomotion

Avant de discuter des modifications cognitives, un premier point doit être abordé concernant l'observation des animaux. En effet, nous avons noté que le poids des souris *Cbs* hétérozygotes ainsi que des *Ts1Yah/Cbs* était plus bas que le groupe sauvage. Les *Ts1Yah* seules ne présentent pas de problème métabolique. La perte d'une copie de *Cbs* induit un génotype à 2 copies pour ce gène chez les individus *Ts1Yah/Cbs* : pourquoi ont-elles un poids plus faibles ? Il n'a jamais été décrit dans la littérature une perte de poids d'animaux mutés pour un seul allèle de la CBS, quelque soit le fond génétique (Akahoshi et al., 2008; Gupta & Kruger, 2011). Les études ont répertoriés des courbes de poids dans les semaines suivant la naissance ; lors de notre dernière prise de poids, les souris sont âgées de 6 mois. Il pourrait s'agir d'une modification du métabolisme dû à l'âge ; jeunes, les animaux ne seraient pas impactés par le déficit de *Cbs* mais sur un poids plus stable, le métabolisme changerait et apparaîtrait cet écart, somme toute très relatif au vu de la différence de poids existante entre des animaux hétérozygotes et homozygotes pour la mutation. Pour confirmer ce phénotype, il faudrait réaliser des courbes de poids sur un ensemble d'animaux en élevage, ne subissant aucune expérimentation. Ce qui nous interpelle, et qui nous fait penser que ce n'est pas un biais du lot, c'est que cette variation de poids se retrouve chez les animaux *Tg(Hcbs)/Tg(Cre)*. Chez ce groupe, le poids est très légèrement inférieur au reste des animaux (2 g d'écart). Selon les tests réalisés dans un futur proche, la pertinence de ce résultat déterminera de la suite d'une étude métabolique sur le projet de la CBS.

La trisomie de la région ne modifie pas le comportement moteur des souris. Les Ts1Yah sont toujours capables d'apprendre la tâche sur la barre tournante et également de se maintenir sur cet axe à des vitesses constantes et croissantes au cours du temps. Ces résultats obtenus grâce à la cohorte Ts1Yah x Cbs+/- confirment les données de la littérature (Pereira et al., 2009). En revanche, les souris monosomiques Ms2Yah, qui elles aussi n'ont pas de trouble de coordination, ont par contre des difficultés à acquérir l'apprentissage menant à une amélioration de leurs performances. Chez ces souris monosomiques, des processus de consolidation de l'apprentissage seraient perturbés. Il a été montré que des circuits neuronaux différents s'associaient soit à la performance propre (cortex moteur / cervelet) soit à l'apprentissage de l'exercice (cortex cingulaire / striatum / hippocampe) (R. M. Costa, Cohen, & Nicolelis, 2004; Wachter et al., 2010). C'est principalement au cours de la phase de consolidation de l'apprentissage que les Ms2Yah sont déficientes (Krakauer & Shadmehr, 2006). Cette phase est cruciale dans le phénomène de transfert de cette nouvelle aptitude dans un circuit neuronal stable qui permettra la création d'un automatisme et non plus d'un apprentissage. Il est donc possible que ce circuit de transfert d'informations soit altéré et que les Ms2Yah restent dans une phase constante d'apprentissage et n'arrivent pas à augmenter leurs performances. Ces mécanismes impliquent notamment les voies ERK (1/2) dans tous les centres nerveux cités précédemment, et l'expression de ces protéines varie au cours des phases précoces et tardives de l'entraînement (Bureau, Carrier, Lebel, & Cyr, 2010). Pour explorer cette piste, d'autres protocoles peuvent être adoptés, notamment avec plus de 4 essais par jours (il en existe avec 10 essais par jour) et sur plus de jours d'entraînement pour définir si les souris monosomiques peuvent atteindre un niveau de performance égal aux sauvages.

Dans un second temps, ces souris monosomiques ont été croisées avec le modèle du syndrome de Down Tc1, présentant 81% des gènes du chromosome 21 humain en 3 copies, dans le but d'évaluer l'implication des 12 gènes souris, avec leurs homologues humains présents dans la région *Abcg1-U2af1*, dans les phénotypes des souris Tc1. Les souris Ms2Yah ont été élevées sur un fond pur C57BL/6J ; les Tc1 quant à elles sont conservées sur un fond mixte B6C3B. La différence entre l'étude de référence (Duchon, Pothion, et al., 2011) et celle décrite dans ce manuscrit repose sur ces fonds génétiques : la cohorte Tc1 x Ms2Yah est issue du croisement direct entre les 2 lignées établies comme indiqué précédemment. Nous avons donc croisé ces mâles Ms2Yah B6J par des femelles Tc1 F1 B6C3B pour obtenir une population sur fond mixte N2 B6xF1B6C3B. Ce nouveau support a permis dans un premier temps de confirmer la robustesse des phénotypes sur un nouveau fond génétique, puis dans un deuxième temps d'explorer les possibles restaurations de ces déficits. Le modèle Tc1 est cité

aujourd'hui comme une référence dans l'étude chez l'animal du syndrome de Down. Plusieurs capacités sont altérées chez ces souris, conséquences du chromosome 21 humain surnuméraire. Ces troubles touchent aussi bien la mémoire que la locomotion. Des tests spécifiques ces défauts, comme par exemple les exercices en piscine de Morris ou en open field, ont mis en évidence des défauts de mémoire à court terme et un caractère d'hyperactivité. En test de rotarod, les souris Tc1 expriment une incapacité à rester sur l'axe même à des vitesses de rotation faibles (Galante et al., 2009; Morice et al., 2008; O'Doherty et al., 2005b). Dans l'étude présentée dans ce manuscrit, certains phénotypes se confirment, notamment les déficits locomoteurs, mais d'autres disparaissent ou sont modifiés.

Les souris Tc1 ont été caractérisées sur le plan locomoteur sur différent test, à savoir le rotarod, le rod statique, le test de l'empreinte de la marche (Galante et al., 2009) et récemment la barre crantée (Duchon, Pothion, et al., 2011). Dans tous ces tests les souris transchromosomiques présentent des déficits sévères ; dans l'étude de la cohorte Tc1M2Yah, seul le rotarod a été reproduit, mais il soutient les résultats de la littérature et redémontrent les troubles précédemment décrits. Sur la période d'apprentissage, les souris Tc1 avec 2 ou 3 copies de la région *Abcg1-U2af1* sont incapables de se maintenir sur l'axe tournant. La région cible n'influence pas la coordination motrice, les déficits sont donc dus à la surexpression de gènes hors de *Abcg1-U2af1* et hors de *Cstb-Prmt2*. Le phénotype intéressant est apparu sur le groupe Tc1Ms2Yah. Même si ces animaux ne peuvent améliorer leur performance durant l'entraînement, sur de petites vitesses, ils sont capables de se maintenir plus longtemps sur l'axe tournant que les souris Tc1, mais les deux groupes retrouvent des profils similaires dès que la vitesse atteint 16 rpm. En 1968, Jones et Roberts (B. J. Jones & Roberts, 1968) ont publié une étude pionnière dans la compréhension de la locomotion des rongeurs en décrivant l'aptitude des souris à améliorer le temps qu'elles passent sur la barre chaque jour ; si l'entraînement ne fonctionne pas, le temps de chute reste constant. Si au contraire il fonctionne, les souris engagent un processus d'apprentissage. Les jours qui suivent le niveau de performance plateau sont associés à une désactivation des processus d'apprentissage mais les automatismes instaurés sont maintenus (Rustay, Wahlsten, & Crabbe, 2003). Dans notre expérience, l'entraînement des groupes Tc1 et Tc1Ms2Yah n'a pas d'effet sur la locomotion déjà sévèrement touchée chez ces animaux ; la région *Abcg1-U2af1* n'est donc pas responsable de la perte de fonction des mécanismes d'apprentissage.

La deuxième partie du test fut le rotarod à vitesse constante. Le groupe Tc1 n'exprime le même profil dans le test d'apprentissage et tombe significativement plus vite de la barre que les souris sauvages. Comme énoncé dans plusieurs paragraphes précédemment, l'impact

du fond génétique particulier pourrait prendre part aux phénotypes de sauvetage partiel montrés par les Tc1Ms2Yah. Une étude de 2006 (Nadler et al., 2006) comparant plusieurs fonds génétiques sur des protocoles standards de test de locomotion a établi que les souris C3H, fond à partir duquel C3B a été dérivé, chutent plus rapidement que les souris B6. Mais cette éventualité ne semble pas être l'hypothèse principale dans notre expérience puisqu'aucun effet de fond n'a été observé dans le test en vitesse accélérée. La participation de la région *Abcg1-U2af1* dans l'apprentissage moteur n'est donc pas probante mais son implication dans le système locomoteur automatisé est certaine.

II. Altération des fonctions cognitives lors de variations du nombre de copies de la région de synténie Mmu17 : rôle clé de *Cbs*

A. Symptôme autistique :

Au cours du protocole expérimentale de la cohorte Tc1 x Ms2Yah, un comportement à attiré notre attention: l'interaction sociale conditionnée dans le test de préférence pour la nouveauté. Ce test n'a malheureusement pas été réalisé jusqu'alors sur le modèle trisomique partiel Ts1Yah ; les résultats obtenus ne dépendent que des effets de la perte d'une copie de la région ciblée. Il apparaît donc indispensable pour parfaire cette expérience de pouvoir comparer les phénotypes présents chez les Ts1 et Ms2Yah. L'étude du modèle monosomique seul à déjà apporté des convictions sur la dépendance du processus de sociabilisation vis-à-vis de la région *Abcg1-U2af1*. 2 phénotypes inattendus apparaissent ; d'un côté, dans le registre de divergence de fonds génétiques, l'absence de sociabilisation des Tc1 disparaît lorsqu'il n'y a qu'un passage sur le fond C3B.. A l'inverse, le groupe Ms2Yah a montré une inhibition de préférence pour la nouveauté dans le test complet de sociabilité. Ces souris sont capables d'interagir avec un nouveau congénère mais quand le second est ajouté dans leur environnement, les animaux préfèrent retourner vers l'individu familier au lieu de créer de nouveaux liens avec une nouvelle connaissance. Ce caractère est particulier aux Ms2Yah puisque le groupe Tc1Ms2Yah différencient les individus proposés durant la session et interagissent davantage avec le nouveau congénère. Avec 2 ou 3 copies de la région *Abcg1-U2af1*, les souris se comportent comme les sauvages ; mais avec une seule copie, le déficit apparaît. Un défaut dans la mémoire à court terme pourrait en être la cause, néanmoins l'étude du modèle isolé (Ms2Yah) ne montre pas d'altération dans les différents types de mémoire. Ce trait particulier ne serait pas donc mémoire dépendant, mais plutôt associé à un syndrome

autistique. Moy *et al* étudient depuis de nombreuses années la sociabilisation des rongeurs, avec pour modèle la souris, et ont mis au point plusieurs tests d'interactions sociales (Moy et al., 2004; Moy et al., 2007). Les rongeurs sont des animaux qui vivent en société et nécessitent d'interagir constamment avec leur congénères. Comme pour de nombreux paramètres, le comportement varie en fonction des fonds ; les C57BL/6J réussissent ce test en utilisant plus de temps et créant plus de contacts avec des nouveaux animaux, préférentiellement de la même lignée. Ce phénotype a déjà été retrouvé dans des modèles d'autisme et de retard mental chez la souris, par exemple dans le modèle K.O. *Shank2* où, en plus du déficit de sociabilité, d'autres phénotypes des Ms2Yah coïncident comme une fréquence des EPSP plus élevée (LTP) et un retard de performance en rotarod (Schmeisser et al., 2012). Nous ne l'avons pas fait sur ce groupe mais il serait très intéressant de mesurer la quantité et la fréquence des vocalisations. Ces dernières évoluent en fonction de la situation, de l'âge et du sexe de l'individu (Hamilton et al., 2011). Ces communications vocales sont étroitement liées aux communications odorantes laissées par le marquage du territoire par l'urine et les fèces (Wohr, Rouillet, Hung, Sheng, & Crawley, 2011). Ce second paramètre pourrait lui aussi être quantifié car il traduit de manière fiable le stress d'une souris mais aussi l'accapitation d'un nouveau territoire. L'odeur portée et répandue par les rongeurs sert de marquage physique de l'espace individuel et permet donc d'établir des rapports hiérarchiques dans une population. En référence à l'étude transcriptomique, certains gènes extraits sont associés à des fonctions neurologiques dont par exemple le gène *Dgll*. Ce gène est impliqué dans une microdélétion 3q29 associée à des syndromes psychiatriques et autistiques. (Quintero-Rivera, Sharifi-Hannauer, & Martinez-Agosto, 2010) 2 cas ont été étudiés ; ils présentent une déficience mentale sévère, un historique autistique avec des antécédents de troubles bipolaires. De nombreux troubles comportementaux ont été relevés, de la tendance suicidaire à une agressivité exacerbée. Les autres gènes exploités, y compris ceux de la région *Abcg1-U2af1* qui pourraient être candidats aux modifications comportementales, sont décrits dans les résultats et discussion du projet d'étude du modèle monosomique Ms2Yah (page 136).

B. Perturbations des fonctions de mémoires :

Depuis l'étude de Lopes en 2009, la région de synténie du Mmu17 apparait comme nouveau modulateur de l'expression génique du Hsa21. C'est pourquoi les modèles Ts1Yah et Ms2Yah sont plus précisément étudiés et comparés avec les autres grands modèles de

référence. Du point de vue cognitif, la corrélation entre les capacités d'apprentissage et la plasticité synaptique ont été suggérées depuis de nombreuses années. Cette LTP particulière a été retrouvée chez les deux modèles de variations de doses de la région cible. Un phénotype cérébral a été observé chez les Ms2Yah : une meilleure performance en fin de session dans le test de conditionnement contextuel à la peur. L'augmentation de la LTP *in vivo* associée à l'immobilisation (« freezing ») a également été décrit (Sahun et al., 2007; Whitlock, Heynen, Shuler, & Bear, 2006b). En effet, même si les Ms2Yah présentent un profil de LTP du même ordre que les Ts1Yah, les réponses physiologiques semblent être différentes ; les Ms2Yah n'ont pas de troubles mnésiques aussi marqués que les Ts1Yah. Les monosomiques ne présentent pas de troubles de mémoire déclarative (reconnaissance d'objet ou labyrinthe en Y) mais un défaut de mémoire associative. Chez ces souris, il persiste une dissociation entre la fonction hippocampique dans la mémoire spatiale, la reconnaissance d'objets et la mémoire associée à la peur, avec un profil différents des Ts1Yah. La modification de la plasticité synaptique des Ts1Yah, plus importante que celle des Ms2Yah, induirait des perturbations plus diverses dans l'activité cérébrale. Cela suggère une réponse génétique différente entre une augmentation et une diminution de dose d'une même région génétique. La monosomie induit des effets très limités sur le génome entier avec 2 groupes de gènes dérégulés dans l'hippocampe des souris Ms2Yah ; des clusters de gènes apparaissent dans cette analyse, avec des similitudes de fonctions, par exemple dans la membrane post synaptique (*Park2*, *Dlg1*, *Grid2ip*, *Gabrr1*, *Gabrr2*), ou dans la régulation de l'excitabilité neuronale calcium dépendante (*Camk2d*, *Kcnn3*, *Cacna1g*, *Sl00a10*). En prenant en compte des similarités et différences trouvées dans la trisomie de la même région chromosomique, l'hypothèse de la présence de gènes clés régulant des réponses neuronales est renforcée. Evidemment, *Cbs*, *Ndufv3*, *Wdr4* et *Pde9a* sont de très bons candidats et il serait intéressant d'évaluer leurs interactions, dans le contexte de la trisomie 21, avec les autres gènes du chromosome 21. C'est pourquoi nous avons voulu évaluer l'impact de la région sur un grand modèle de trisomie murin, le modèle Tc1.

Nous avons alors généré un groupe d'animaux issus du croisement Tc1 x Ms2Yah ; le premier test comportemental d'observation appliqué aux animaux fut l'open field. Durant cette tâche, chaque animal explore une arène sans aucun indice visuel ni stimulus extérieur ; le pattern exploratoire mesuré qui, selon l'instinct physiologique des rongeurs indépendamment de l'espèce, guide l'animal vers des lieux où il peut se protéger rapidement. C'est pourquoi dans ce genre de test, la souris passe plus de temps en périphérie de l'arène que dans la région centrale plus exposée, et donc anxiogène résultant d'une réponse

émotionnelle adaptative. Une fois le danger évité, la souris va explorer son environnement et initier une collecte d'informations. La durée de notre test est de 30 minutes, suffisant pour l'enregistrement d'informations, permet à l'animal de se familiariser avec son environnement : il s'agit de la phase d'habituation (Salomons et al., 2010; Thompson & Spencer, 1966). Chez les souris Tc1, ce pattern est différent puisque la distance parcourue et l'activité verticale (rearing) sont augmentées par rapport aux contrôles. Ce résultat a été confirmé dans deux études différentes, avec des fonds génétiques différents, qui attribuent ce phénomène à de l'hyperactivité (Galante et al., 2009; Morice et al., 2008). Ce phénotype, au demeurant robuste, n'a malheureusement pas été retrouvé dans notre étude. Dans le protocole de notre étude l'étape d'habituation durait 30 minutes, alors que dans celle de Galante les 3 sessions étaient de 10 minutes sur 3 jours. En sommant les distances parcourues sur ces 3 sessions, la distance parcourue (environ 45 mètres pour les sauvages et 70 pour les Tc1) est très inférieure à celle observée dans notre population (plus de 100 mètres pour tous les groupes). Un important screening comparatif de l'activité basale sur plusieurs fonds génétiques purs, a montré que les souches murines C3H ont une activité exploratoire plus faible que le fond C57BL/6J (Bolivar, Caldarone, Reilly, & Flaherty, 2000; Gubner, Wilhelm, Phillips, & Mitchell, 2010) et cela a été retrouvé dans plusieurs grandes structures comportementalistes européennes (Mandillo et al., 2008). Le caractère hyperactif dépisté pourrait alors être masqué par le simple fait que tous les groupes ont par origine une exploration plus active. La différence à ce niveau entre les Tc1 et les sauvages n'est alors plus significative. Effectivement, le fond utilisé pour la cohorte Tc1Ms2Yah est un fond hybride C57BL/6JxC3B mais avec un passage sur C3B en moins par rapport à l'étude de Duchon et al. Les changements comportementaux s'expliquent par les différents allèles mis en jeu entre les fonds. Ces allèles agissent de manières différentes sur les fonctions physiologiques. Par exemple une analyse comparative de séquençage du génome a montré que la voie amyloïde est beaucoup plus exprimée dans les souches C3H que C57BL/6, cela pourrait prendre part à l'activité basale plus faible des C3H (Auerbach et al., 2010).

La part de C57BL/6J a amplifié un phénotype qui n'était pas significatif dans l'étude de Morice (2008) : le déficit dans le transfert d'apprentissage en version reversal de la piscine de Morris. Ce profil rappelle celui des souris Tg(Dyrk1a)(Altafaj et al., 2001). En plus des variations de fond, d'autres paramètres influent sur l'expression génique des souris Tc1. Il faut savoir que même si la machinerie de transcription/traduction murine s'emploie sur les régions promotrices humaines, et que les protéines synthétisées par le transchromosome peuvent agir dans la cellule, certaines régions conservées non codantes régulent des gènes espèce-spécifique (Coller & Kruglyak, 2008). La deuxième remarque repose sur la

ségrégation du transchromosome au cours des mitoses de la première chimère. En effet, toutes les cellules d'un adulte Tc1 n'ont pas intégré ce chromosome humain, et d'après l'étude de Fisher et al. seulement 66% des cellules cérébrales possèdent l'extra chromosome (O'Doherty et al., 2005b).

Après les premières conclusions sur l'importance de la région du Mmu17 du point de vue de la réduction quantitative de copie, nous nous sommes penchés sur l'activité moléculaire du cerveau des souris trisomiques Ts1Yah. Ces souris expriment des déficits cognitifs notamment dans la fonction de mémoire déclarative. Nous avons voulu observer au niveau cellulaire quels étaient les changements induits par l'augmentation de doses de la région cible. L'étude du transcriptome de l'hippocampe de notre modèle murin a permis de mettre en évidence des catégories de gènes dérégulés qui pourraient prétendre à expliquer les phénotypes connus, principalement ceux impactant la cognition. Sur la totalité des 384 gènes codant dérégulés, très peu sont sous exprimés dans l'hippocampe des souris Ts1Yah (15) et parmi eux, trois gènes se dégagent du groupe avec des propriétés neurologiques. Le premier gène est *Girk3(Kir3)*, protéine canal potassique impliqué dans le mécanisme de manque dans des modèles d'addiction à la morphine (Del Burgo et al., 2008). Cette protéine s'exprime dans l'hippocampe, précisément dans les neurones glutamatergiques et GABAergiques mais aucun phénotype mnésique n'a été décrit. Le second est *Crhr1*, gène qui code pour le récepteur de l'hormone corticotrope. Ce gène est connu pour ses aptitudes premières dans les voies de stress, via l'activité des glucocorticoïdes, la reproduction ou encore l'immunité. La caractéristique qui nous ont interpellé est qu'il est nécessaire à la transmission neuronale dans l'hippocampe et semble relier au comportement anxigène chez la souris (Refojo et al., 2011). Enfin le gène *Nurr1(Nr4a2)*, codant pour un récepteur nucléaire, voit son expression changée dans une étude comparative entre une population de souris élevées en groupe et une autre composée de souris isolées. Une analyse du transcriptome du gyrus denté de ces animaux a montré que le gène *Nurr1* était sous exprimé dans la population isolée (Ibi et al., 2008).

A l'inverse, la plus grande partie des gènes (369) se trouvent surexprimés. Au total, 43 gènes ont des liens plus ou moins direct avec des fonctions neurologiques, phénotypes comportementaux identifiés chez les souris trisomiques. En premier lieu, nous trouvons le gène *Camk2a* (FC=1,25); ce gène code pour une kinase Ca^{2+} dépendante. Cette protéine est indispensable à l'activité post synaptique excitatrice, notamment dans l'hippocampe. Elle contrôle la formation de la LTP spécifiquement dans les neurones et, plus récemment, dans les interneurons inhibiteurs (Lamsa, Irvine, Giese, & Kullmann, 2007). Pour une valeur un peu plus élevée (FC=1,28), nous avons repéré le gène *Kalrn*, codant pour la Kalirine. L'étude

du modèle K.O. est particulièrement intéressant puisqu'il démontre la possibilité de générer des changements d'induction de LTP sans perturbation anatomique de l'hippocampe, ni structurale au niveau dendritique. La LTP dépendante de la Kalirine est donc synaptique dépendante (Xie et al., 2011). Dans notre modèle Ts1Yah, des modifications d'expression génique, moins sévère qu'une inactivation complète de gène, pourraient s'orienter sur ce modèle d'explication de l'augmentation de LTP. Un « top gène » apparaît surexprimé (FC=1,40), d'un niveau comparable aux personnes SD : le gène *App*. Il est connu pour être le moteur de l'apparition de la maladie d'Alzheimer. Dans la plupart des cas, les symptômes apparaissent suite à une mutation du gène ; dans la pathologie liée à la trisomie 21, la surexpression est, elle aussi, symptomatologique, puisque les patients présentent des phénotypes de type Alzheimer beaucoup plus précocement que la population générale (Coppus et al., 2012). Chez la souris, une surexpression de l'APP humaine non muté induit des perturbations des mémoires spatiale et de reconnaissance, des anomalies du cytosquelette ainsi qu'une dégénérescence cellulaire dans l'hippocampe et le cortex entorhinal (Simon et al., 2009). Néanmoins, si la surexpression est vérifiée dans le modèle Ts1Yah, il serait intéressant de comprendre comment les 2 copies d'*App* sont régulées par la région *Abcg1-U2af1* alors que la surexpression pathologique dans le syndrome de Down est due à la présence de 3 copies du gène : les symptômes communs seront ils comparables au niveau mécanisme cellulaire ? Le gène *Ncam1* a également attiré notre attention (FC=1,46). La plupart des molécules d'adhésion neuronale ont des rôles cruciaux dans l'expansion neuronale et la communication intercellulaire. Des peptides de synthèse mimant l'effet Ncam ont montré une forte affinité pour le récepteur au FGF et la stimulation de celui-ci induit de nombreux phénotypes neurologiques (Dallerac et al., 2011). Les souris stimulées présentent des altérations de plasticité synaptique à travers une augmentation de la LTP précoce, mais aussi le maintien post 24h de la LTP tardive. Il faut cependant prendre ces résultats avec précautions, car ces données sont issues de stimulations artificielles, et à l'heure actuelle rien n'a été démontré sur une stimulation naturelle par des concentrations croissantes de NCAM extraites.

Le gène le plus surexprimé dans notre étude est le gène codant pour un récepteur de l'incrétine (peptide mimétique du glucagon) *Glp1r*. La surexpression est très forte puisque le FC atteint 23,68 ; il est donc une cible prioritaire aux altérations cognitives des Ts1Yah. Ce gène est impliqué dans d'importantes fonctions neurobiologiques comme la plasticité synaptique et certains types de mémoire. Chez le modèle K.O. apparaît une diminution de l'anxiété (au niveau exploratoire), un déficit dans le fonctionnement de la mémoire de

reconnaissance non spatiale et une abolition de la LTP (Abbas, Faivre, & Hoelscher, 2009). Beaucoup de ces phénotypes se retrouvent dans le modèle murin trisomique pour la région du *Mmu17*. Cependant, il se pourrait que ce ne soit pas un effet de la diminution d'une copie de la région *Abcg1-U2af1* qui soit en cause dans ce cas. En effet, du point de vue de la localisation génique, ce gène se situe juste en amont du gène *Abcg1*, avec entre eux le gène *Umod11* qui lui ne voit pas son expression modifiée. La surexpression de *Glp1r* est si élevée qu'il pourrait s'agir d'un effet de la construction du modèle de duplication en cis, dans lequel l'insertion des vecteurs nécessaires a pu altérer la structure de l'ADN adjacente. Si tel était le cas, les structures promotrices dans l'environnement proche pourraient également être touchées et parmi elles certaines contrôlant l'expression du gène *Glp1r*.

Parmi les derniers gènes de la liste potentiellement responsable des phénotypes observés, nous nous sommes intéressés aux gènes de la région ciblée ; comme précédemment décrit dans l'introduction, le gène *Cbs* ressort inévitablement avec un FC=1,53. Ces nombreuses relations avec la fonction neuronale ont inévitablement accaparé nos cibles de recherche sur ce gène comme candidat aux perturbations neurologiques de notre modèle murin. Les résultats présentés dans le manuscrit ont prouvé que cette protéine intervient dans la mémorisation des rongeurs. Un nouvel argument nous a été donné par la publication récente d'un phénotype électrophysiologique de la CBS dans l'hippocampe. L'équipe de London a montré que des souris surexprimant un transgène *Cbs* manifestaient une augmentation de LTP maintenue au cours du temps, mimant exactement le profil des souris Ts1Yah.

Ce paragraphe reprend l'ensemble des gènes pouvant contribuer aux altérations cognitives présents chez les souris Ts1Yah. Néanmoins, la liste de gènes extraite de l'analyse révélait des perturbations d'expression génique à bien d'autres niveaux : nous avons identifiés des gènes impliqués dans des fonctions immunologiques (*Tpp2*, *Map4k3* ou *Tcf12*), de reproduction (*Rlf*, *Herc4* ou *Rnf8*) ou encore de développement (*Sox17*, *Chd8* ou *Ryr2*), fonction la plus touchée parallèlement à la neurologie. Une dernière remarque doit être faite sur l'analyse du transcriptome des Ts1Yah comparée aux Ms2Yah. Il en ressort un seul et unique gène commun: *Etd11*. Ce gène se comporte de la même manière dans les 2 lignées de souris, à savoir qu'il est statistiquement surexprimé. Néanmoins, son intérêt dans notre étude est assez faible, il est associé à un syndrome d'hypertrophie cardiaque (Xiao et al., 2012).

Cette étude de biologie moléculaire basée sur la comparaison des ARN extraits des hippocampes de souris Ts1Yah/Ms2Yah vs wt a permis de corréler les phénotypes propres aux modèles par rapport à leur profil d'expression cellulaire ; mais aussi de comparer les

effets respectifs de variations de dose de la région dans le but d'observer des voies de signalisation dépendantes des gènes concernés. Des pistes intéressantes, plus aisément pour le modèle Ts1Yah de part la plus grandes listes de gènes obtenus, se sont dégagées des études distinctes mais il n'y a pas de point commun entre les 2 profils. Les outils complémentaires qu'offrent ces lignées de souris restent indispensables à l'étude du rôle des gènes impliqués dans le SD et uniques à ce jour dans la collection de souris créées à travers le monde scientifique.

Pour appuyer notre hypothèse de gène candidat, nous avons sélectionné le gène au profil le plus convaincant du point de vue génétique et bibliographique à savoir le gène de la CBS. Il est le plus fortement surexprimé parmi les gènes de la région *Abcg1-U2af1* et il est connu pour son implication dans un retard mental chez l'Homme ; il est également un marqueur de risque du développement précoce de la maladie d'Alzheimer. Plusieurs outils ont été associés pour répondre à cette question ; d'une part en réalisant un modèle de suppression allélique de *Cbs* dans un contexte de trisomie partielle du Mm17, et de l'autre une surexpression conditionnelle restreinte au cerveau de souris transgénique pour le gène de la CBS humaine.

Comme expliqué dans les paragraphes précédents, l'exploitation du transcriptome de nos souris nous a aiguillés sur quelques gènes potentiellement responsables des modifications des capacités mnésiques des souris Ts1Yah. Parmi eux, nous avons choisi le gène codant pour la CBS. Ce gène est surexprimé dans l'hippocampe, il régule des cycles importants dans la cellule en général, et particulièrement les neurones. Pour rappeler les descriptions introductives, la CBS intervient dans le cycle de transsulfuration, très important dans la communication intra et interneuronale, de sulfhydratation des protéines, dans la prévention de l'athérosclérose ou encore dans la régulation dilatatoire des vaisseaux sanguins. Enfin, lorsqu'il est muté chez l'Homme, il engendre un retard mental plus ou moins sévère dont la cause moléculaire n'a pas encore été décrite. Chez les souris monosomiques, il n'a pas été décrit de défaut de la mémoire déclarative sensorielle, tout comme chez les *Cbs +/-*. La région, et particulièrement ce gène, n'induit pas d'altération de cette mémoire dans une configuration de réduction de dose. Pour démontrer que ce gène initie les phénotypes observés lors d'une augmentation de dose, deux approches expérimentales impliquant la CBS ont été designés et mettent en évidence que ce gène intervient dans le fonctionnement de la mémoire à court terme. Cette mémoire, utilisée aussi bien dans le labyrinthe en Y que dans le test de reconnaissance d'objets met en jeu les facultés de mémorisation visuelle associées à un comportement instinctif : l'exploration. La nouveauté est toujours préférée au familier par les

rongeurs (rat, souris). Dans le test du labyrinthe en Y, par exemple, la souris déposée au milieu de l'appareil va se diriger aléatoirement dans un bras, puis va enchaîner successivement la visite des autres bras. C'est ce que l'on appelle l'alternance spontanée (Dellu, Contarino, Simon, Koob, & Gold, 2000). Au niveau de nos expériences, le groupe de souris Ts1Yah/Cbs alterne selon pourcentage similaire aux sauvages. Les Ts1Yah se comportant différemment nous pouvons conclure que la fonction de mémoire à court terme est restaurée lorsque l'on diminue la dose de *Cbs*. Le défaut dans le résultat de ce test, est que sur le fond C57BL/6 N, les Ts1Yah alterne à un pourcentage plus élevé que les sauvages, soit un résultat opposé à la littérature. Nous sommes toujours dans un phénotype différent du contrôle mais en sens contraire. Il apparaît indispensable de recommencer l'expérience sur un fond comparable C57BL//6J.

La mémoire à court terme est également utilisée dans la reconnaissance visuelle ; nous avons donc appliqué le test de reconnaissance d'objets sur nos animaux. Quels sont les mécanismes comportementaux mis en jeu: une fois l'animal familiarisé avec l'environnement de test, l'exposition à un premier objet sert de stimulus de nouveauté, et donc le comportement exploratoire vers celui-ci diminuera moins rapidement au cours du temps que l'exploration générale de l'environnement connu (Besheer & Bevins, 2000; Sheldon, 1969). Au cours de la phase de rétention, l'ajout d'un deuxième objet aura le même effet que l'exposition du premier objet et la nouveauté primera à nouveau sur la familiarité ; la souris portera plus d'intérêt à l'objet récemment exposé qu'à l'objet familier. Les mécanismes mis en jeu dans ce processus de reconnaissance mnésique impliquent principalement l'hippocampe, centre nerveux historiquement relié à la mémoire, auquel s'ajoutent des afférences des cortex entorhinal, perirhinal et parahippocampique définissant une néostructure : le MTL (Medial temporal lobe) (Broadbent, Gaskin, Squire, & Clark, 2010; Squire, Wixted, & Clark, 2007).

De nombreuses études ont prouvé l'implication de l'hippocampe dans la mémoire de reconnaissance ; dans un premier temps chez l'humain, plus précisément chez des patients avec des dommages hippocampiques, qui présentent des défauts de reconnaissance (McKee & Squire, 1993; Pascalis & Bachevalier, 1999). Les mêmes constatations ont été faites chez le primate (Pascalis & Bachevalier, 1999), de même pour la souris. Chez ces rongeurs, l'étude de Broadbent a exploré les effets de lésions importantes de l'hippocampe (75-100% du volume) sur la reconnaissance et le temps de rétention de la mémoire. L'équipe a montré que l'hippocampe était impliqué dans la mémorisation à court et moyen terme, mais que d'autres structures intervenaient pour le stockage de l'information sur le long terme (comme le cortex

perirhinal)(Broadbent et al., 2010). Le modèle Ts1Yah ne présente évidemment pas de lésion de l'hippocampe mais un dérèglement de son activité. Néanmoins, dans les 2 cas l'hippocampe ne fonctionne plus normalement et l'on peut donc comparer, de manière modérée, les phénotypes observés dans les 2 cas. Les souris lésées ne pouvant dissocier correctement les objets, nous pouvons penser que le phénotype des Ts1Yah provient en parti de ce dérèglement neurologique de l'hippocampe.

Concernant la cohorte Ts1YahxCbs+/-, la disparition d'une copie de *Cbs* restaure la mémoire à court terme des souris Ts1Yah/Cbs. La perte totale d'une copie de la région du Mmu17 n'entraîne pas à elle seule de modification dans le mécanisme de mémorisation puisque les souris Ms2Yah ne sont pas déficitaires. A l'inverse, une surexpression de la CBS instaure une perte de mémorisation à court terme, comparativement au phénotype Ts1Yah. Il s'avère donc que la CBS soit impliquée dans cette perte de transmission nerveuse au moins dans l'hippocampe. En quoi la CBS intervient-elle dans l'activité neuronale ? Une des particularités de cette enzyme est qu'elle régule la synthèse d'H₂S via son activité de transsulfuration dans le cerveau de manière exclusive. Parmi les rôles de l'H₂S sur les cellules neuronales et gliales, il permet l'entrée par vagues de flux de calcium dans les astrocytes, support vital des neurones. Même s'ils ne sont pas les acteurs de la communication nerveuse, ils participent à la neurotransmission (Nagai, Tsugane, Oka, & Kimura, 2004) ; l'H₂S modifiant l'activité astrocytaire, il peut agir indirectement sur l'activité neuronale, engendrant des variations de la plasticité synaptique (LTP). Le rôle de la CBS dans le stress cellulaire et la vasodilatation rapproche également ce gène de notre hypothèse. En plus de réguler le flux calcique astrocytaire, il régule leur activité nourricière puisque dans un contexte de suractivation de la CBS, l'excédant d'H₂S pourrait maintenir un état de dilatation des vaisseaux, particulièrement dans le cerveau, et entraîner un dérèglement des échanges hémato-cellulaire (R. Wang, 2011). L'H₂S intervenant aussi dans la communication intercellulaire, nous pouvons imaginer que les échanges entre neurones et astrocytes ainsi que neurones/neurones sont exacerbés et cela pourrait expliquer les désordres fonctionnels mis en évidence (Qu et al., 2008).

Un autre paramètre très important à prendre en compte lors d'un test de mémorisation sensorielle est le temps d'exploration durant la phase de familiarisation. En effet, lorsque deux groupes d'animaux présentent des divergences en termes de reconnaissance d'objets, il est important de vérifier le temps passé sur les objets familiers et nouveaux durant la session de familiarisation et de rétention. Si le groupe qui présente l'index de reconnaissance le plus faible est le même que celui qui présente le temps d'exploration le plus faible, alors les

résultats peuvent être biaisés. Dans ce cas, il faut refaire un test en réduisant le temps d'exploration du groupe le plus actif. Le temps maximum d'exploration des objets du groupe le moins actif est mesuré ; ce temps servira de référence pour le groupe « hyperactif » qui verra sa session raccourcie au moment où il aura exploré les objets autant que le premier groupe (Sanderson et al., 2011). Ce test appelé « yoked » est appliqué lorsque le groupe mutant est hyperactif par rapport aux contrôles. Dans notre expérience, le groupe Ts1Yah/Cbs est hyperactif durant le test de familiarisation, mais il en résulte une performance similaire à celle des contrôles, c'est pourquoi nous n'avons pas refait l'expérience. Les Ts1Yah qui ont un phénotype déficitaire ont quant à eux un temps d'exploration similaire aux contrôles.

En sachant que ce modèle murin exprime des défauts de reconnaissance à court terme, il serait intéressant d'approfondir l'étude comportementale à ce niveau en élargissant le protocole sur un modèle de reconnaissance d'objets à 4 tâches décrites ci-dessous (figure 68) :

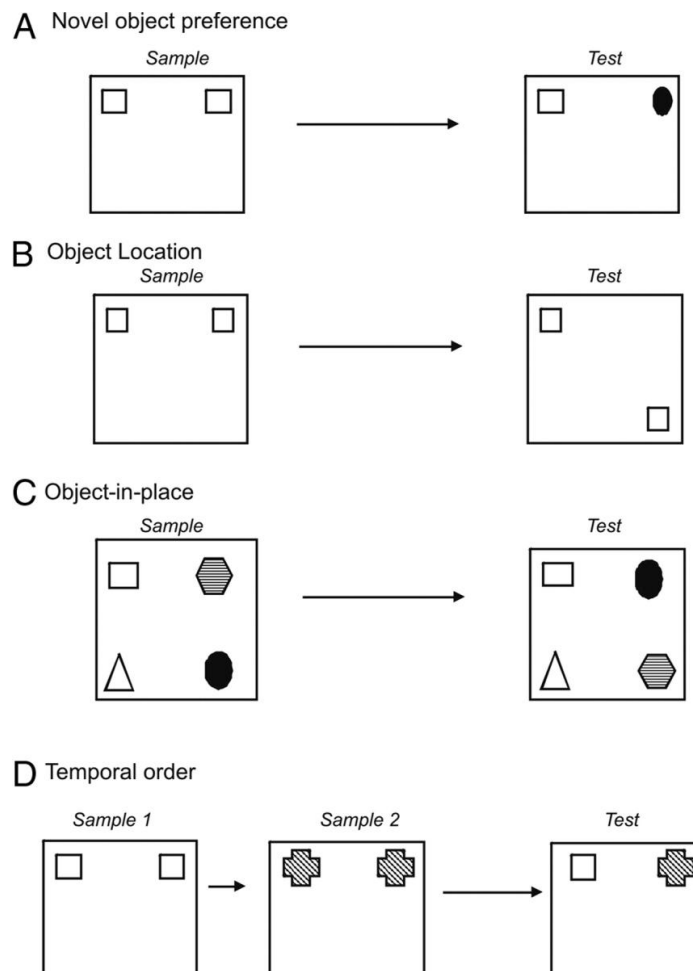


Figure 69 Schéma de positionnement des objets selon la mémoire ciblée par le protocole : (A) Nouvel d'objet ; (B) Localisation de l'objet ; (C) Positionnement des objets et (D) Ordre de présentation des objets.

Dans cette étude, les auteurs ont réussi à associer des structures très précises de l'hippocampe et inclure le paramètre de controlatéralité dans les différents types de mémoires à court terme mis en jeu dans leurs expériences. En adaptant ce protocole aux Ts1Yah, d'autres phénotypes pourraient venir renforcer la validation de ce modèle de choix dans l'étude du syndrome de Down. Les personnes atteintes, plus particulièrement les enfants, présentent des lacunes dans la mémorisation sensorielle, peut être moins au niveau visuel qu'au niveau auditif. Néanmoins, les mécanismes neuronaux mis en jeu restent communs dès lors que l'information a été traduite en influx nerveux vers les centres de la mémoire (hippocampe et cortex perirhinal).

Malgré que la lignée Ms2Yah n'exprime pas de déficit de mémoire à court terme, rappelons-nous que les souris présentent une inhibition d'interaction sociale. Il serait curieux de tester les souris Ts1Yah, trisomiques pour la même région, dans le même contexte. Ce phénotype est assimilé à un trait autistique chez certains patients SD (Dressler, Perelli, Bozza, & Bargagna, 2011). Chez les patients diagnostiqués autistes, il a été décrit une diminution reconnaissance face à de nouveaux stimuli (Pierce & Courchesne, 2001). En fonction des résultats, l'étude de la région *Abcg1-U2af1* pourrait être proposée à des fins de recherche sur l'autisme, certains gènes de la région ou dérégulés pouvant être des supports des mécanismes d'interaction sociale.

CONCLUSION-PERSPECTIVES

I. Conclusion

La nouvelle approche de la trisomie 21 proposée dans ce manuscrit a montré, une fois encore, la complexité d'un syndrome multigénique dans sa modélisation et sa compréhension. La mise en évidence du chromosome surnuméraire chez les personnes SD a remis en cause la prise en charge des patients ; la suppression de ce dernier est impossible avec les outils scientifiques et médicaux actuels. Malgré cela, l'étude de ce syndrome n'a fait qu'augmenté ces dernières décennies ; cela se traduit par une augmentation continue du nombre de publications sur le sujet (figure 69).

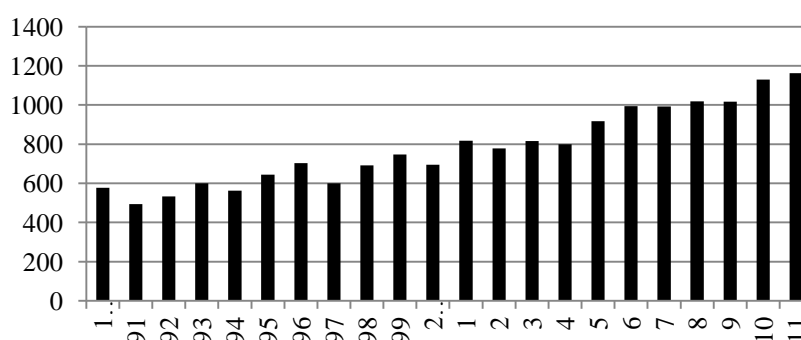


Figure 70 Représentation graphique de l'évolution du nombre de publications par année depuis 1990 avec pour thématique le syndrome de Down (données PubMed).

Notre approche fut pour le moins ciblée, puisque sur les 225 gènes connus sur le chromosome 21, nous nous sommes intéressés à une petite région de 12 gènes localisés en région télomérique du Hsa21. A travers la comparaison moléculaire et comportementale des deux modèles monosomiques et trisomiques de cette région *Abcg1-U2af1*, nous avons mis en évidence la nécessité d'une dose physiologique de l'intervalle génétique pour un fonctionnement normal de diverses fonctions biologiques. En effet, que ce soit un ajout ou un retrait d'une copie de la région, des perturbations locomotrices et cognitives apparaissent à des degrés divers. Dans un contexte sauvage, une perte de copie entraîne des perturbations dans l'apprentissage sans toucher aux capacités locomotrices, avec une perte également de l'endurance à long terme; dans un contexte de trisomie la diminution de cette même région n'améliore pas des capacités locomotrices très médiocres, mais permet un rétablissement temporaire du déplacement sur des vitesses faibles. Chez les personnes SD, la locomotion apparaît défectueuse dès la naissance. Même si ces inaptitudes ne semblent pas réversibles chez l'adulte, un traitement précoce chez l'enfant de type « inhibition du surdosage du *Mmu17* » pourrait potentiellement permettre de travailler plus efficacement le travail

locomoteur et améliorer la marche de ces personnes, leur procurant une meilleure autonomie quotidienne.

Nous avons également vu que cet intervalle intervenait dans le stockage d'information à court terme, à travers un contrôle de la potentialisation interneuronale dans la structuration du processus mémoriel établie dans l'hippocampe. La réduction de dose de cette région a révélé une inhibition de l'interaction sociale des animaux dans un contexte de préférence pour la nouveauté. Par ailleurs, les souris Ms2Yah répondent de manière plus probante au test de mémoire associative de conditionnement à la peur. Ces 2 paramètres comportementaux sont associés à un phénomène déjà détecté chez les Ts1Yah, à savoir une hypersensibilité neuronale entraînant un maintien de la LTP plus élevé dans le temps que les animaux contrôles. Il apparaît donc que certains gènes soient irréfutablement vitaux dans l'activité cellulaire de noyaux centraux. A ce titre, le gène de la CBS a montré qu'il était un des acteurs majeurs de cette dérégulation. En jouant sur le nombre de dose et le contexte génétique, nous avons démontré que la mémoire à court terme nécessitait une quantité physiologique de CBS afin de fonctionner de manière optimale.

Cette région, et particulièrement ce gène, présente un nouveau centre d'intérêt dans l'étude du syndrome de Down. La référence du modèle Ts65Dn n'est donc maintenant plus unique, et nous espérons avoir apporté de nouveaux arguments pour poursuivre la recherche dans ce domaine. Parmi les perspectives à court terme, il serait très intéressant de mesurer l'activité hippocampique chez les animaux Ts1Yah/Cbs pour observer une modification de la LTP, qui pourrait expliquer le sauvetage phénotypique mesuré dans notre projet. Il serait également judicieux d'observer au niveau cellulaire l'organisation et la structure des neurones de l'hippocampe afin d'estimer du point de vue microscope quels sont les modificateurs de l'activité neuronale (nombre de dendrites, la maturation des épines ...). Toutes ces découvertes ont pour but d'appliquer nos recherches sur les personnes trisomiques ; c'est pourquoi, la plus grande des perspectives est thérapeutique.

II. Perspectives thérapeutiques

La plupart des thématiques de recherche ne sont donc plus basées sur l'inactivation totale du chromosome dans les cellules, mais sur la compréhension et l'inhibition de gènes clés dans les phénotypes les plus impactant de la vie courante. En tête de liste, la compréhension et la recherche de traitement pour améliorer les capacités cognitives, et ceux dès le plus jeune âge, centralisent le plus l'attention des chercheurs. L'outil principal des

différentes études a été le modèle souris de référence Ts65Dn. Une revue récente de Contestabile reprend tous les essais précliniques effectués à ce jour ciblant l'augmentation des capacités cognitives de l'animal (Contestabile, Benfenati, & Gasparini, 2010). Parmi les résultats les plus prometteurs, le pentylentetrazole (PTZ) en a été la molécule pionnière. Elle a pour rôle d'inhiber la neurotransmission via une action antagoniste des récepteurs GABA_A. Des doses chroniques non épileptogène ont permis de rétablir une LTP similaire aux sauvages, (Fernandez et al., 2007) restaurant le fonctionnement de la mémoire déclarative et l'apprentissage des animaux. Aujourd'hui, les molécules références sont les agonistes inverses (AI): elles ont les propriétés d'un antagoniste via le fait qu'elles inhibent l'activité du récepteur, mais elles n'empêchent pas l'agoniste physiologique de se fixer sur ce dernier; il n'y pas de compétition entre les deux. Le premier AI utilisé sur le modèle murin fut l' α_5 AI; son injection chronique n'a pas eu d'effet sur le niveau endogène de récepteurs GABA_A α_5 . (Braudeau, Delatour, et al., 2011). Cet AI a démontré qu'il pouvait rétablir les performances mnésiques sur les tests de reconnaissance d'objets et d'apprentissage spatial (MWM). L'effet secondaire majeur est qu'il n'est pas seulement un améliorateur cognitif chez les souris trisomiques, mais il augmente également les performances des sauvages. Ces effets se vérifiant pour l'instant qu'à court terme, des études sont en cours pour mesurer l'impact sur le long terme. D'autres molécules n'ont malheureusement pas abouti à des résultats positifs, du fait de leur inefficacité ou de leurs effets aversifs trop prononcés; ces cas on été retrouvé dans des traitements au donepezil et la fluoxetine (Heinen et al., 2012).

Les AI et autres ayant prouvé leur efficacité chez l'animal, des études cliniques ont été récemment mise en place dans le but d'améliorer les aptitudes cognitives des personnes SD. Tout d'abord, en 2006, un traitement clinique avec la mémantine a débuté pour une période d'un an. Cette molécule est sur le marché actuellement dans la prévention de la démence chez les patients atteints d'Alzheimer. Son activité repose sur le blocage de manière antagoniste des récepteurs NMDA. Malgré les résultats prometteurs chez la souris Ts65Dn (Rueda et al., 2010), l'étude clinique ne s'est pas avérée positive puisque qu'aucune différence entre le groupe sain et le groupe SD âgé de 40 ans n'a été observée (Hanney et al., 2012). En 2008, une étude Taïwanaise a été lancée sur un traitement d'une année de patients SD avec un inhibiteur de l'acétylcholinestérase : la rivastigmine. En 2009, c'est l'entreprise Hoffmann-La Roche qui a initié l'étude d'un AI des GABA_A α_5 sur les performances intellectuelles des patients SD. La molécule testée chez la souris, le RO4938581, a montré des effets majeurs sur l'apprentissage spatial et la LTP (présentation poster de Fernandez et al. – Forum Européen de la Société des Neurosciences 2012).

Ces projets sont axés sur l'amélioration de performance, mais ne ciblent pas le chromosome 21. Parallèlement à ces modèles d'étude, Le screening de molécules ciblant des protéines spécifiques à la T21 est en cours, notamment avec la protéine *dyrk1a*. Ce gène a montré depuis plusieurs années qu'il était responsable de nombreux phénotypes de la T21, comme des anomalies craniofaciales, un retard d'apprentissage, des difficultés locomotrices (Altafaj et al., 2001; Dierssen et al., 2001). La suppression de la dose excédentaire de cette protéine chez la souris a montré un rétablissement partiel de fonction cérébrale (Guedj et al., 2009). L'inhibiteur testé est extrait du thé vert, et est donc commercialisé sans autorisation de mise sur le marché. Des études chez l'homme sont actuellement en cours. Nous savons que *Dyrk1a* et *Cbs* entretiennent des régulations croisées et leur taux varie dépendamment l'un de l'autre. Il serait donc envisageable de développer ce genre de projet pour la CBS. A ce propos, la fondation française Jerome LEJEUNE concentre ses recherches sur la trisomie 21 et a fait un appel d'offre cette année pour développer des inhibiteurs de synthèse de la CBS. Notre étude précurseur a apporté des résultats très prometteurs et ouvre la possibilité d'instruire une étude préclinique sur l'utilisation de molécules thérapeutiques afin d'améliorer les capacités intellectuelles des personnes SD.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ET PUBLICATIONS

- ABBAS, T., FAIVRE, E., & HOELSCHER, C. (2009). Impairment of synaptic plasticity and memory formation in GLP-1 receptor KO mice: Interaction between type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 205(1).
- ABE, K., & KIMURA, H. (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *Journal of Neuroscience*, 16(3), 1066-1071.
- AHMED, Z., DOUGLAS, M. R., READ, M. L., BERRY, M., & LOGAN, A. (2011). Citron kinase regulates axon growth through a pathway that converges on cofilin downstream of RhoA. *Neurobiol Dis*, 41(2), 421-429.
- AKAHOSHI, N., KOBAYASHI, C., ISHIZAKI, Y., IZUMI, T., HIMI, T., SUEMATSU, M., & ISHII, I. (2008). Genetic background conversion ameliorates semi-lethality and permits behavioral analyses in cystathionine beta-synthase-deficient mice, an animal model for hyperhomocysteinemia. *Human Molecular Genetics*, 17(13), 1994-2005.
- ALTAFAJ, X., DIERSSEN, M., BAAMONDE, C., MARTI, E., VISA, J., GUIMERA, J., OSET, M., GONZALEZ, J. R., FLOREZ, J., FILLAT, C., & ESTIVILL, X. (2001). Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Human Molecular Genetics*, 10(18), 1915-1923.
- ANASTAS, S. B., MUELLER, D., SEMPLE-ROWLAND, S. L., BREUNIG, J. J., & SARKISIAN, M. R. (2011). Failed cytokinesis of neural progenitors in citron kinase-deficient rats leads to multiciliated neurons. *Cereb Cortex*, 21(2), 338-344.
- ANTONARAKIS, S. E., LYLE, R., DERMITZAKIS, E. T., REYMOND, A., & DEUTSCH, S. (2004). Chromosome 21 and Down syndrome: From genomics to pathophysiology. *Nature Reviews Genetics*, 5(10), 725-738.
- ANTSAKLIS, A., PAPANTONIOU, N., XYGAKIS, A., MESOGITIS, S., TZORTZIS, E., & MICHALAS, S. (2000). Genetic amniocentesis in women 20-34 years old: associated risks. *Prenatal Diagnosis*, 20(3), 247-250.
- ARQUÉ, G., FOTAKI, V., FERNÁNDEZ, D., MARTÍNEZ DE LAGRÁN, M., ARBONÉS, M., & DIERSSEN, M. (2008). Impaired spatial learning strategies and novel object recognition in mice haploinsufficient for the dual specificity tyrosine-regulated kinase-1A (Dyrk1A). *PLoS One*, 3(7), e2575.
- AUERBACH, S. S., THOMAS, R., SHAH, R., XU, H., VALLANT, M. K., NYSKA, A., & DUNNICK, J. K. (2010). Comparative Phenotypic Assessment of Cardiac Pathology, Physiology, and Gene Expression in C3H/HeJ, C57BL/6J, and B6C3F1/J Mice. *Toxicologic Pathology*, 38(6), 923-942.
- BALES, K. R., PLATH, N., SVENSTRUP, N., & MENNITI, F. S. (2010). Phosphodiesterase Inhibition to Target the Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Neurodegenerative Diseases*, 6, 57-90.
- BELICHENKO, P. V., MASLIAH, E., KLESCHEVNIKOV, A. M., VILLAR, A. J., EPSTEIN, C. J., SALEHI, A., & MOBLEY, W. C. (2004). Synaptic structural abnormalities in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Journal of Comparative Neurology*, 480(3), 281-298.
- BEN-SHACHAR, D., & KARRY, R. (2008). Neuroanatomical Pattern of Mitochondrial Complex I Pathology Varies between Schizophrenia, Bipolar Disorder and Major Depression. *Plos One*, 3(11).
- BESHEER, J., & BEVINS, R. A. (2000). The role of environmental familiarization in novel-object preference. *Behavioural Processes*, 50(1), 19-29.
- BITTLES, A. H., BOWER, C., HUSSAIN, R., & GLASSON, E. J. (2007). The four ages of Down syndrome. *European Journal of Public Health*, 17(2), 221-225.
- BOLIVAR, V. J., CALDARONE, B. J., REILLY, A. A., & FLAHERTY, L. (2000). Habituation of activity in an open field: A survey of inbred strains and F-1 hybrids. *Behavior Genetics*, 30(4), 285-293.
- BRAUDEAU, J., DAUPHINOT, L., DUCHON, A., LOISTRON, A., DODD, R. H., HÉRAULT, Y., DELATOUR, B., & POTIER, M. C. (2011). Chronic Treatment with a Promnesiant GABA-A α 5-Selective Inverse Agonist Increases Immediate Early Genes Expression during Memory Processing in Mice and Rectifies Their Expression Levels in a Down Syndrome Mouse Model. *Adv Pharmacol Sci*, 2011, 153218.

- BRAUDEAU, J., DELATOUR, B., DUCHON, A., PEREIRA, P. L., DAUPHINOT, L., DE CHAUMONT, F., OLIVO-MARIN, J. C., DODD, R. H., HERAULT, Y., & POTIER, M. C. (2011). Specific targeting of the GABA-A receptor alpha 5 subtype by a selective inverse agonist restores cognitive deficits in Down syndrome mice. *Journal of Psychopharmacology*, *25*(8), 1030-1042.
- BROADBENT, N. J., GASKIN, S., SQUIRE, L. R., & CLARK, R. E. (2010). Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learning & Memory*, *17*(1), 794-800.
- BROWN, J. H., JOHNSON, M. H., PATERSON, S. J., GILMORE, R., LONGHI, E., & KARMILOFF-SMITH, A. (2003). Spatial representation and attention in toddlers with Williams syndrome and Down syndrome. *Neuropsychologia*, *41*(8), 1037-1046.
- BUREAU, G., CARRIER, M., LEBEL, M., & CYR, M. (2010). Intrastratial inhibition of extracellular signal-regulated kinases impaired the consolidation phase of motor skill learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, *94*(1), 107-115.
- BUTLER, C., KNOX, A. J., BOWERSOX, J., FORBES, S., & PATTERSON, D. (2006). The production of transgenic mice expressing human cystathionine beta-synthase to study Down syndrome. *Behavior Genetics*, *36*(3), 429-438.
- CARLESIMO, G. A., MAROTTA, L., & VICARI, S. (1997). Long-term memory in mental retardation: Evidence for a specific impairment in subjects with Down's syndrome. *Neuropsychologia*, *35*(1), 71-79.
- CHERNOFF, A. I. (1959). THE DISTRIBUTION OF THE THALASSEMIA GENE - A HISTORICAL REVIEW. *Blood*, *14*(8), 899-912.
- CHIM, S. S. C., JIN, S. N., LEE, T. Y. H., LUN, F. M. F., LEE, W. S., CHAN, L. Y. S., JIN, Y. J., YANG, N., TONG, Y. K., LEUNG, T. Y., LAU, T. K., DING, C. M., CHIU, R. W. K., & LO, Y. M. D. (2008). Systematic search for placental DNA-methylation markers on chromosome 21: Toward a maternal plasma-based epigenetic test for fetal trisomy 21. *Clinical Chemistry*, *54*(3), 500-511.
- CLARK, D., & WILSON, G. N. (2003). Behavioral assessment of children with Down syndrome using the Reiss psychopathology scale. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *118A*(3), 210-216.
- CLARKE, R., LEWINGTON, S., & LANDRAY, M. (2003). Homocysteine, renal function, and risk of cardiovascular disease. *Kidney International*, *63*, S131-S133.
- COLLER, H. A., & KRUGLYAK, L. (2008). It's the sequence, stupid! *Science*, *322*(5900), 380-381.
- CONTESTABILE, A., BENFENATI, F., & GASPARINI, L. (2010). Communication breaks-Down: From neurodevelopment defects to cognitive disabilities in Down syndrome. *Progress in Neurobiology*, *91*(1), 1-22.
- COPPUS, A. M. W., SCHUUR, M., VERGEER, J., JANSSENS, A. C. J. W., OOSTRA, B. A., VERBEEK, M. M., & VAN DUIJN, C. M. (2012). Plasma beta amyloid and the risk of Alzheimer's disease in Down syndrome. *Neurobiology of aging*, *33*(9).
- COSTA, A. C. S., & GRYBKO, M. J. (2005). Deficits in hippocampal CA1 LTP induced by TBS but not HFS in the Ts65Dn mouse: A model of Down syndrome. *Neuroscience Letters*, *382*(3), 317-322.
- COSTA, R. M., COHEN, D., & NICOLELIS, M. A. L. (2004). Differential corticostriatal plasticity during fast and slow motor skill learning in mice. *Current Biology*, *14*(13), 1124-1134.
- D'HOOGE, R., & DE DEYN, P. P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews*, *36*(1), 60-90.
- DALLERAC, G., ZERWAS, M., NOVIKOVA, T., CALLU, D., LEBLANC-VEYRAC, P., BOCK, E., BEREZIN, V., RAMPON, C., & DOYERE, V. (2011). The neural cell adhesion molecule-derived peptide FGL facilitates long-term plasticity in the dentate gyrus in vivo. *Learning & Memory*, *18*(5).
- DAS, A. V., JAMES, J., ZHAO, X., RAHNENFÜHRER, J., & AHMAD, I. (2004). Identification of c-Kit receptor as a regulator of adult neural stem cells in the mammalian eye: interactions with Notch signaling. *Dev Biol*, *273*(1), 87-105.
- DEL BURGO, L. S., CORTES, R., MENGOD, G., ZARATE, J., ECHEVARRIA, E., & SALLES, J. (2008). Distribution and neurochemical characterization of neurons expressing GIRK channels in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, *510*(6), 581-606.

- DELABAR, J. M., THEOPHILE, D., RAHMANI, Z., CHETTOUH, Z., BLOUIN, J. L., PRIEUR, M., NOEL, B., & SINET, P. M. (1993). Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Hum Genet*, *1*(2), 114-124.
- DELLU, F., CONTARINO, A., SIMON, H., KOOB, G. F., & GOLD, L. H. (2000). Genetic differences in response to novelty and spatial memory using a two-trial recognition task in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, *73*(1), 31-48.
- DEMAS, G. E., NELSON, R. J., KRUEGER, B. K., & YAROWSKY, O. J. (1996). Spatial memory deficits in segmental trisomic Ts65Dn mice. *Behavioural Brain Research*, *82*(1), 85-92.
- DEMAS, G. E., NELSON, R. J., KRUEGER, B. K., & YAROWSKY, P. J. (1998). Impaired spatial working and reference memory in segmental trisomy (Ts65Dn) mice. *Behavioural Brain Research*, *90*(2), 199-201.
- DHALLAN, R., AU, W. C., MATTAGAJASINGH, S., EMCHE, S., BAYLISS, P., DAMEWOOD, M., CRONIN, M., CHOU, V., & MOHR, M. (2004). Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation. *Jama-Journal of the American Medical Association*, *291*(9), 1114-1119.
- DHALLAN, R., GUO, X., EMCHE, S., DAMEWOOD, M., BAYLISS, P., CRONIN, M., BARRY, J., BETZ, J., FRANZ, K., GOLD, K., VALLECILLO, B., & VARNEY, J. (2007). A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. *Lancet*, *369*(9560), 474-481.
- DIERSSEN, M., FOTAKI, V., ALTAF AJ, X., BAAMONDE, C., MARTINEZ-CUE, C., LUMBRERAS, M., CASAS, C., VISA, J., GUIMER, J., FILLAT, C., FLOREZ, J., ARBONES, M. L., & ESTIVILL, X. (2001). Murine models of over- and underexpression of Dyrk1a, and the role of DYRK1A in Down syndrome. *Cytogenetics and Cell Genetics*, *92*(1-2), 9-9.
- DIERSSEN, M., HERAULT, Y., & ESTIVILL, X. (2009). Aneuploidy: From a Physiological Mechanism of Variance to Down Syndrome. *Physiological Reviews*, *89*(3), 887-920.
- DIERSSEN, M., HERAULT, Y., & ESTIVILL, X. (2009). Aneuploidy: from a physiological mechanism of variance to Down syndrome. *Physiol Rev*, *89*(3), 887-920.
- DOWDY, S. F., SCANLON, D. J., FASCHING, C. L., CASEY, G., & STANBRIDGE, E. J. (1990). IRRADIATION MICROCELL-MEDIATED CHROMOSOME TRANSFER (XMMCT) - THE GENERATION OF SPECIFIC CHROMOSOMAL ARM DELETIONS. *Genes Chromosomes & Cancer*, *2*(4), 318-327.
- DRESSLER, A., PERELLI, V., BOZZA, M., & BARGAGNA, S. (2011). The autistic phenotype in Down syndrome: differences in adaptive behaviour versus Down syndrome alone and autistic disorder alone. *Functional Neurology*, *26*(3), 151-158.
- DUCHON, A., POTHION, S., BRAULT, V., SHARP, A. J., TYBULEWICZ, V. L. J., FISHER, E. M. C., & HERAULT, Y. (2011). The telomeric part of the human chromosome 21 from Cstb to Prmt2 is not necessary for the locomotor and short-term memory deficits observed in the Tc1 mouse model of Down syndrome. *Behavioural Brain Research*, *217*(2), 271-281.
- DUCHON, A., RAVEAU, M., CHEVALIER, C., NALESSO, V., SHARP, A. J., & HERAULT, Y. (2011). Identification of the translocation breakpoints in the Ts65Dn and Ts1Cje mouse lines: relevance for modeling down syndrome. *Mammalian Genome*, *22*(11-12), 674-684.
- EPISKOPOU, V. (2005). SOX2 functions in adult neural stem cells. *Trends Neurosci*, *28*(5), 219-221.
- ESBENSEN, A. J., SELTZER, M. M., & KRAUSS, M. W. (2008). Stability and change in health, functional abilities, and behavior problems among adults with and without Down syndrome. *American Journal on Mental Retardation*, *113*(4), 263-277.
- ETO, K., ASADA, T., ARIMA, K., MAKIFUCHI, T., & KIMURA, H. (2002). Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *293*(5), 1485-1488.
- ETO, K., & KIMURA, H. (2002). A novel enhancing mechanism for hydrogen sulfide-producing activity of cystathionine beta-synthase. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(45), 42680-42685.
- FASQUELLE, L., SCOTT, H. S., LENOIR, M., WANG, J., REBILLARD, G., GABOYARD, S., VENTEO, S., FRANCOIS, F., MAUSSET-BONNEFONT, A. L., ANTONARAKIS, S. E., NEIDHART, E., CHABBERT, C., PUEL, J. L., GUIPPONI, M., & DELPRAT, B. (2011). Tmprss3, a Transmembrane Serine

- Protease Deficient in Human DFN8/10 Deafness, Is Critical for Cochlear Hair Cell Survival at the Onset of Hearing. *Journal of Biological Chemistry*, 286(19), 17383-17397.
- FERNANDEZ, F., MORISHITA, W., ZUNIGA, E., NGUYEN, J., BLANK, M., MALENKA, R. C., & GARNER, C. C. (2007). Pharmacotherapy for cognitive impairment in a mouse model of Down syndrome. *Nature Neuroscience*, 10(4), 411-413.
- FERRETTI, E., VILLAESCUSA, J. C., DI ROSA, P., FERNANDEZ-DIAZ, L. C., LONGOBARDI, E., MAZZIERI, R., MICCIO, A., MICALI, N., SELLERI, L., FERRARI, G., & BLASI, F. (2006). Hypomorphic mutation of the TALE gene Prep1 (pKnox1) causes a major reduction of Pbx and Meis proteins and a pleiotropic embryonic phenotype. *Molecular and Cellular Biology*, 26(15), 5650-5662.
- FERRETTI, M. T., PARTRIDGE, V., LEON, W. C., CANNEVA, F., ALLARD, S., ARVANITIS, D. N., VERCAUTEREN, F., HOULE, D., DUCATENZEILER, A., KLEIN, W. L., GLABE, C. G., SZYF, M., & CUELLO, A. C. (2011). Transgenic Mice as a Model of Pre-Clinical Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, 8(1), 4-23.
- FERRI, A. L., CAVALLARO, M., BRAIDA, D., DI CRISTOFANO, A., CANTA, A., VEZZANI, A., OTTOLENGHI, S., PANDOLFI, P. P., SALA, M., DEBIASI, S., & NICOLIS, S. K. (2004). Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development*, 131(15), 3805-3819.
- GALANTE, M., JANI, H., VANES, L., DANIEL, H., FISHER, E. M. C., TYBULEWICZ, V. L. J., BLISS, T. V. P., & MORICE, E. (2009). Impairments in motor coordination without major changes in cerebellar plasticity in the Tc1 mouse model of Down syndrome. *Human Molecular Genetics*, 18(8), 1449-1463.
- GEDEON, A. K., BAKER, E., ROBINSON, H., PARTINGTON, M. W., GROSS, B., MANCA, A., KORN, B., POUSTKA, A., YU, S., SUTHERLAND, G. R., & MULLEY, J. C. (1992). FRAGILE-X SYNDROME WITHOUT CCG AMPLIFICATION HAS AN FMR1 DELETION. *Nature Genetics*, 1(5), 341-344.
- GEROVASSILI, A., GARNER, C., NICOLAIDES, K. H., THEIN, S. L., & REES, D. C. (2007). Free fetal DNA in maternal circulation: a potential prognostic marker for chromosomal abnormalities? *Prenatal Diagnosis*, 27(2), 104-110.
- GILMORE, L., & CUSKELLY, M. (2009). A longitudinal study of motivation and competence in children with Down syndrome: early childhood to early adolescence. *Journal of Intellectual Disability Research*, 53, 484-492.
- GRUART, A., MUNOZ, M. D., & DELGADO-GARCIA, J. M. (2006). Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *Journal of Neuroscience*, 26(4), 1077-1087.
- GUBNER, N. R., WILHELM, C. J., PHILLIPS, T. J., & MITCHELL, S. H. (2010). Strain Differences in Behavioral Inhibition in a Go/No-go Task Demonstrated Using 15 Inbred Mouse Strains. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*, 34(8), 1353-1362.
- GUEDJ, F., SEBRIE, C., RIVALS, I., LEDRU, A., PALY, E., BIZOT, J. C., SMITH, D., RUBIN, E., GILLET, B., ARBONES, M., & DELABAR, J. M. (2009). Green Tea Polyphenols Rescue of Brain Defects Induced by Overexpression of DYRK1A. *Plos One*, 4(2).
- GUIDI, S., BONASONI, P., CECCARELLI, C., SANTINI, D., GUALTIERI, F., CIANI, E., & BARTESAGHI, R. (2008). Neurogenesis impairment and increased cell death reduce total neuron number in the hippocampal region of fetuses with Down syndrome. *Brain Pathology*, 18(2), 180-197.
- GUPTA, S., & KRUGER, W. D. (2011). Cystathionine Beta-Synthase Deficiency Causes Fat Loss in Mice. *Plos One*, 6(11).
- GUPTA, S., KUHNISCH, J., MUSTAFA, A., LHOTAK, S., SCHLACHTERMAN, A., SLIFKER, M. J., KLEIN-SZANTO, A., HIGH, K. A., AUSTIN, R. C., & KRUGER, W. D. (2009). Mouse models of cystathionine beta-synthase deficiency reveal significant threshold effects of hyperhomocysteinemia. *Faseb Journal*, 23(3), 883-893.
- GUREVICIENE, I., IKONEN, S., GUREVICIUS, K., SARKAKI, A., VAN GROEN, T., PUSSINEN, R., YLINEN, A., & TANILA, H. (2004). Normal induction but accelerated decay of LTP in APP+PS1 transgenic mice. *Neurobiology of Disease*, 15(2), 188-195.

- HAMELET, J., NOLL, C., RIPOLL, C., PAUL, J.-L., JANEL, N., & DELABAR, J.-M. (2009). Effect of hyperhomocysteinemia on the protein kinase DYRK1A in liver of mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 378(3).
- HAMILTON, S. M., SPENCER, C. M., HARRISON, W. R., YUVA-PAYLOR, L. A., GRAHAM, D. F., DAZA, R. A. M., HEVNER, R. F., OVERBEEK, P. A., & PAYLOR, R. (2011). Multiple autism-like behaviors in a novel transgenic mouse model. *Behavioural Brain Research*, 218(1), 29-41.
- HAN, Y., QIN, J., CHANG, X. Z., YANG, Z. X., BU, D. F., & DU, J. B. (2005). Modulating effect of hydrogen sulfide on gamma-aminobutyric acid B receptor in recurrent febrile seizures in rats. *Neuroscience Research*, 53(2), 216-219.
- HANNEY, M., PRASHER, V., WILLIAMS, N., JONES, E. L., AARSLAND, D., CORBETT, A., LAWRENCE, D., YU, L. M., TYRER, S., FRANCIS, P. T., JOHNSON, T., BULLOCK, R., BALLARD, C., & RESEARCHERS, M. T. (2012). Memantine for dementia in adults older than 40 years with Down's syndrome (MEADOWS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 379(9815), 528-536.
- HATTORI, M., FUJIYAMA, A., TAYLOR, T. D., WATANABE, H., YADA, T., PARK, H. S., TOYODA, A., ISHII, K., TOTOKI, Y., CHOI, D. K., SOEDA, E., OHKI, M., TAKAGI, T., SAKAKI, Y., TAUDIEN, S., BLECHSCHMIDT, K., POLLEY, A., MENZEL, U., DELABAR, J., KUMPF, K., LEHMANN, R., PATTERSON, D., REICHWALD, K., RUMP, A., SCHILLHABEL, M., SCHUDY, A., ZIMMERMANN, W., ROSENTHAL, A., KUDOH, J., SHIBUYA, K., KAWASAKI, K., ASAKAWA, S., SHINTANI, A., SASAKI, T., NAGAMINE, K., MITSUYAMA, S., ANTONARAKIS, S. E., MINOSHIMA, S., SHIMIZU, N., NORDSIEK, G., HORNISCHER, K., BRANDT, P., SCHARFE, M., SCHON, O., DESARIO, A., REICHEL, J., KAUER, G., BLOCKER, H., RAMSER, J., BECK, A., KLAGES, S., HENNIG, S., RIESELMANN, L., DAGAND, E., HAAF, T., WEHRMEYER, S., BORZYM, K., GARDINER, K., NIZETIC, D., FRANCIS, F., LEHRACH, H., REINHARDT, R., YASPO, M. L., GRONER, Y., & CHROMOSOME 21 MAPPING SEQUENCING, C. (2000). The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature*, 405(6784), 311-319.
- HEINEN, M., HETTICH, M., RYAN, D. P., SCHNELL, S., PAESLER, K., & EHNINGER, D. (2012). Adult-Onset Fluoxetine Treatment Does Not Improve Behavioral Impairments and May Have Adverse Effects on the Ts65Dn Mouse Model of Down Syndrome. *Neural Plasticity*.
- HERNANDEZ, C., SANTAMATILDE, E., MCCREATH, K. J., CERVERA, A. M., DIEZ, I., ORTIZ-MASIA, D., MARTINEZ, N., CALATAYUD, S., ESPLUGUES, J. V., & BARRACHINA, M. D. (2009). Induction of trefoil factor (TFF)1, TFF2 and TFF3 by hypoxia is mediated by hypoxia inducible factor-1: implications for gastric mucosal healing. *British Journal of Pharmacology*, 156(2), 262-272.
- HILL, C. A., REEVES, R. H., & RICHTSMEIER, J. T. (2007). Effects of aneuploidy on skull growth in a mouse model of Down syndrome. *Journal of Anatomy*, 210(4), 394-405.
- HOLTZMAN, D. M., SANTUCCI, D., KILBRIDGE, J., CHUACOUZENS, J., FONTANA, D. J., DANIELS, S. E., JOHNSON, R. M., CHEN, K., SUN, Y. L., CARLSON, E., ALLEVA, E., EPSTEIN, C. J., & MOBLEY, W. C. (1996). Developmental abnormalities and age-related neurodegeneration in a mouse model of Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(23), 13333-13338.
- HUANG, T., WAHLQVIST, M. L., & LI, D. (2010). Docosahexaenoic acid decreases plasma homocysteine via regulating enzyme activity and mRNA expression involved in methionine metabolism. *Nutrition*, 26(1), 112-119.
- HULTEN, M. (2008). On the Origin of Down syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 45, S32-S32.
- IBI, D., TAKUMA, K., KOIKE, H., MIZOGUCHI, H., TSURITANI, K., KUWAHARA, Y., KAMEI, H., NAGAI, T., YONEDA, Y., NABESHIMA, T., & YAMADA, K. (2008). Social isolation rearing-induced impairment of the hippocampal neurogenesis is associated with deficits in spatial memory and emotion-related behaviors in juvenile mice. *Journal of Neurochemistry*, 105(3), 921-932.
- ICHINOHE, A., KANAUMI, T., TAKASHIMA, S., ENOKIDO, Y., NAGAI, Y., & KIMURA, H. (2005). Cystathionine beta-synthase is enriched in the brains of Down's patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(3), 1547-1550.

- IRIZARRY, R. A., HOBBS, B., COLLIN, F., BEAZER-BARCLAY, Y. D., ANTONELLIS, K. J., SCHERF, U., & SPEED, T. P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, *4*(2), 249-264.
- JIN, K., MAO, X. O., SUN, Y., XIE, L., & GREENBERG, D. A. (2002). Stem cell factor stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *J Clin Invest*, *110*(3), 311-319.
- JONES, B. J., & ROBERTS, D. J. (1968). QUANTITATIVE MEASUREMENT OF MOTOR INCOORDINATION IN NAIVE MICE USING AN ACCELERATING ROTAROD. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *20*(4), 302-&.
- JONES, E. L., HANNEY, M., FRANCIS, P. T., & BALLARD, C. G. (2009). Amyloid beta concentrations in older people with Down syndrome and dementia. *Neuroscience Letters*, *451*(2), 162-164.
- KAGAN, K. O., WRIGHT, D., BAKER, A., SAHOTA, D., & NICOLAIDES, K. H. (2008). Screening for trisomy 21 by maternal age, fetal nuchal translucency thickness, free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, *31*(6), 618-624.
- KAMOUN, P. (2001). Mental retardation in Down syndrome: a hydrogen sulfide hypothesis. *Medical Hypotheses*, *57*(3), 389-392.
- KAMOUN, P., BELARDINELLI, M. C., CHABLI, A., LALLOUCHI, K., & CHADEFAX-VEKEMANS, B. (2003). Endogenous hydrogen sulfide overproduction in Down syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *116A*(3), 310-311.
- KELLENDONK, C., TRONCHE, F., CASANOVA, E., ANLAG, K., OPPERK, C., & SCHUTZ, G. (1999). Inducible site-specific recombination in the brain. *Journal of Molecular Biology*, *285*(1), 175-182.
- KESSLAK, J. P., NAGATA, S. F., LOTT, I., & NALCIOGLU, O. (1994). MAGNETIC-RESONANCE-IMAGING ANALYSIS OF AGE-RELATED-CHANGES IN THE BRAINS OF INDIVIDUALS WITH DOWNSYNDROME. *Neurology*, *44*(6), 1039-1045.
- KIMURA, H. (2002). Hydrogen sulfide as a neuromodulator. *Molecular Neurobiology*, *26*(1), 13-19.
- KLESCHVNIKOV, A. M., BELICHENKO, P. V., EPSTEIN, C. J., VILLAR, A. J., MALENKA, R., & MOBLEY, W. C. (2004). Reduced LTP and enhanced inhibition in dentate gyrus of Ts65Dn mice, a model for Down's syndrome. *Neurobiology of Aging*, *25*, S252-S252.
- KLESCHVNIKOV, A. M., BELICHENKO, P. V., FAIZI, M., JACOBS, L. F., HTUN, K., SHAMLOO, M., & MOBLEY, W. C. (2012). Deficits in Cognition and Synaptic Plasticity in a Mouse Model of Down Syndrome Ameliorated by GABA(B) Receptor Antagonists. *Journal of Neuroscience*, *32*(27), 9217-9227.
- KLESCHVNIKOV, A. M., BELICHENKO, P. V., GALL, J., GEORGE, L., NOSHENY, R., MALONEY, M. T., SALEHI, A., & MOBLEY, W. C. (2012). Increased efficiency of the GABAA and GABAB receptor-mediated neurotransmission in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Neurobiology of Disease*, *45*(2), 683-691.
- KLESCHVNIKOV, A. M., BELICHENKO, P. V., VILLAR, A. J., EPSTEIN, C. J., MALENKA, R. C., & MOBLEY, W. C. (2004). Hippocampal long-term potentiation suppressed by increased inhibition in the Ts65Dn mouse, a genetic model of Down syndrome. *Journal of Neuroscience*, *24*(37), 8153-8160.
- KONCZAK, J., & TIMMANN, D. (2007). The effect of damage to the cerebellum on sensorimotor and cognitive function in children and adolescents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *31*(8), 1101-1113.
- KORBEL, J. O., TIROSH-WAGNER, T., URBAN, A. E., CHEN, X. N., KASOWSKI, M., DAI, L., GRUBERT, F., ERDMAN, C., GAO, M. C., LANGE, K., SOBEL, E. M., BARLOW, G. M., AYLSWORTH, A. S., CARPENTER, N. J., CLARK, R. D., COHEN, M. Y., DORAN, E., FALIK-ZACCAI, T., LEWIN, S. O., LOTT, I. T., MCGILLIVRAY, B. C., MOESCHLER, J. B., PETTENATI, M. J., PUESCHEL, S. M., RAO, K. W., SHAFFER, L. G., SHOHAT, M., VAN RIPER, A. J., WARBURTON, D., WEISSMAN, S., GERSTEIN, M. B., SNYDER, M., & KORENBERG, J. R. (2009). The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(29), 12031-12036.

- KORENBERG, J. R., CHEN, X. N., SCHIPPER, R., SUN, Z., GONSKY, R., GERWEHR, S., CARPENTER, N., DAUMER, C., DIGNAN, P., DISTECHE, C., GRAHAM, J. M., HUGDINS, L., MCGILLIVRAY, B., MIYAZAKI, K., OGASAWARA, N., PARK, J. P., PAGON, R., PUESCHEL, S., SACK, G., SAY, B., SCHUFFENHAUER, S., SOUKUP, S., & YAMANAKA, T. (1994). DOWN-SYNDROME PHENOTYPES - THE CONSEQUENCES OF CHROMOSOMAL IMBALANCE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(11), 4997-5001.
- KRAKAUER, J. W., & SHADMEHR, R. (2006). Consolidation of motor memory. *Trends in Neurosciences*, *29*(1), 58-64.
- KRAUS, J. P., JANOSIK, M., KOZICH, V., MANDELL, R., SHIH, V., SPERANDEO, M. P., SEBASTIO, G., DE FRANCHIS, R., ANDRIA, G., KLUIJTMANS, L. A. J., BLOM, H., BOERS, G. H. J., GORDON, R. B., KAMOUN, P., TSAI, M. Y., KRUGER, W. D., KOCH, H. G., OHURA, T., & GAUSTADNES, M. (1999). Cystathionine beta-synthase mutations in homocystinuria. *Human Mutation*, *13*(5), 362-375.
- KROKER, K. S., RAST, G., GIOVANNINI, R., MARTI, A., DORNER-CIOSSEK, C., & ROSENBROCK, H. (2012). Inhibition of acetylcholinesterase and phosphodiesterase-9A has differential effects on hippocampal early and late LTP. *Neuropharmacology*, *62*(5-6), 1964-1974.
- LAMSA, K., IRVINE, E. E., GIESE, K. P., & KULLMANN, D. M. (2007). NMDA receptor-dependent long-term potentiation in mouse hippocampal interneurons shows a unique dependence on Ca(2+)/calmodulin-dependent kinases. *Journal of Physiology-London*, *584*(3), 885-894.
- LEJEUNE, J., GAUTIER, M., & TURPIN, R. (1959). ETUDE DES CHROMOSOMES SOMATIQUES DE NEUF ENFANTS MONGOLIENS. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences*, *248*(11), 1721-1722.
- LIGNON, J. M., BICHLER, Z., HIVERT, B., GANNIER, F. E., COSNAY, P., DEL RIO, J. A., MIGLIORE-SAMOUR, D., & MALECOT, C. O. (2008). Altered heart rate control in transgenic mice carrying the KCNJ6 gene of the human chromosome 21. *Physiological Genomics*, *33*(2), 230-239.
- LINDSTRAND, A., MALMGREN, H., SAHLÉN, S., SCHOUMANS, J., NORDGREN, A., ERGANDER, U., HOLM, E., ANDERLID, B. M., & BLENNOW, E. (2010). Detailed molecular and clinical characterization of three patients with 21q deletions. *Clin Genet*, *77*(2), 145-154.
- LO, Y. M. D. (2009). Noninvasive prenatal detection of fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma nucleic acid analysis: a review of the current state of the art. *Bjog-an International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, *116*(2), 152-157.
- LO, Y. M. D., CORBETTA, N., CHAMBERLAIN, P. F., RAI, V., SARGENT, I. L., REDMAN, C. W. G., & WAINSCOAT, J. S. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, *350*(9076), 485-487.
- LOPES PEREIRA, P., MAGNOL, L., SAHÚN, I., BRAULT, V., DUCHON, A., PRANDINI, P., GRUART, A., BIZOT, J., CHADEFaux-VEKEMANS, B., DEUTSCH, S., TROVERO, F., DELGADO-GARCÍA, J., ANTONARAKIS, S., DIERSSEN, M., & HERAULT, Y. (2009). A new mouse model for the trisomy of the Abcg1-U2af1 region reveals the complexity of the combinatorial genetic code of down syndrome. *Hum Mol Genet*, *18*(24), 4756-4769.
- LOTT, I. T., & DIERSSEN, M. (2010). Cognitive deficits and associated neurological complications in individuals with Down's syndrome. *Lancet Neurology*, *9*(6), 623-633.
- LOTT, I. T., DORAN, E., NGUYEN, V. Q., TOURNAY, A., MOVSESYAN, N., & GILLEN, D. L. (2012). Down Syndrome and Dementia: Seizures and Cognitive Decline. *Journal of Alzheimers Disease*, *29*(1), 177-185.
- LYLE, R., BENA, F., GAGOS, S., GEHRIG, C., LOPEZ, G., SCHINZEL, A., LESPINASSE, J., BOTTANI, A., DAHOUN, S., TAINE, L., DOCO-FENZY, M., CORNILLET-LEFEBVRE, P., PELET, A., LYONNET, S., TOUTAIN, A., COLLEAUX, L., HORST, J., KENNERKNECHT, I., WAKAMATSU, N., DESCARTES, M., FRANKLIN, J. C., FLORENTIN-ARAR, L., KITSIOU, S., YAHYA-GRAISON, E. A., COSTANTINE, M., SINET, P. M., DELABAR, J. M., & ANTONARAKIS, S. E. (2009). Genotype-phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. *European Journal of Human Genetics*, *17*(4), 454-466.
- MACDONALD, M. E., AMBROSE, C. M., DUYAO, M. P., MYERS, R. H., LIN, C., SRINIDHI, L., BARNES, G., TAYLOR, S. A., JAMES, M., GROOT, N., MACFARLANE, H., JENKINS, B., ANDERSON, M. A.,

- WEXLER, N. S., GUSELLA, J. F., BATES, G. P., BAXENDALE, S., HUMMERICH, H., KIRBY, S., NORTH, M., YOUNGMAN, S., MOTT, R., ZEHETNER, G., SEDLACEK, Z., POUSTKA, A., FRISCHAUF, A. M., LEHRACH, H., BUCKLER, A. J., CHURCH, D., DOUCETTESTAMM, L., ODO NOVAN, M. C., RIBARAMIREZ, L., SHAH, M., STANTON, V. P., STROBEL, S. A., DRATHS, K. M., WALES, J. L., DERVAN, P., HOUSMAN, D. E., ALTHERR, M., SHIANG, R., THOMPSON, L., FIELDER, T., WASMUTH, J. J., TAGLE, D., VALDES, J., ELMER, L., ALLARD, M., CASTILLA, L., SWAROOP, M., BLANCHARD, K., COLLINS, F. S., SNELL, R., HOLLOWAY, T., GILLESPIE, K., DATSON, N., SHAW, D., & HARPER, P. S. (1993). A NOVEL GENE CONTAINING A TRINUCLEOTIDE REPEAT THAT IS EXPANDED AND UNSTABLE ON HUNTINGTONS-DISEASE CHROMOSOMES. *Cell*, 72(6), 971-983.
- MANDILLO, S., TUCCI, V., HOLTER, S. M., MEZIANE, H., AL BANCHAABOUCI, M., KALLNIK, M., LAD, H. V., NOLAN, P. M., OUAGAZZAL, A. M., COGHILL, E. L., GALE, K., GOLINI, E., JACQUOT, S., KREZEL, W., PARKER, A., RIET, F., SCHNEIDER, I., MARAZZITI, D., AUWERX, J., BROWN, S. D. M., CHAMBON, P., ROSENTHAL, N., TOCCHINI-VALENTINI, G., & WURST, W. (2008). Reliability, robustness, and reproducibility in mouse behavioral phenotyping: a cross-laboratory study. *Physiological Genomics*, 34(3), 243-255.
- MAURER, M., BURRI, S., DE MARCHI, S., HULLIN, R., MARTINELLI, M., MOHACSI, P., & HESS, O. M. (2010). Plasma homocysteine and cardiovascular risk in heart failure with and without cardiorenal syndrome. *International Journal of Cardiology*, 141(1), 32-38.
- MCKEE, R. D., & SQUIRE, L. R. (1993). ON THE DEVELOPMENT OF DECLARATIVE MEMORY. *Journal of Experimental Psychology-Learning Memory and Cognition*, 19(2), 397-404.
- MENENDEZ, M. (2005). Down syndrome, Alzheimer's disease and seizures. *Brain & Development*, 27(4), 246-252.
- METNEKI, J., & CZEIZEL, A. E. (2005). Increasing total prevalence rate of cases with Down syndrome in Hungary. *European Journal of Epidemiology*, 20(6), 525-535.
- MINAMI, T., HORIUCHI, K., MIURA, M., ABID, M. R., TAKABE, W., NOGUCHI, N., KOHRO, T., GE, X. J., ABURATANI, H., HAMAKUBO, T., KODAMA, T., & AIRD, W. C. (2004). Vascular endothelial growth factor-and thrombin-induced termination factor, down syndrome critical region-1, attenuates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(48), 50537-50554.
- MIYAGI, S., MASUI, S., NIWA, H., SAITO, T., SHIMAZAKI, T., OKANO, H., NISHIMOTO, M., MURAMATSU, M., IWAMA, A., & OKUDA, A. (2008). Consequence of the loss of Sox2 in the developing brain of the mouse. *FEBS Lett*, 582(18), 2811-2815.
- MONCASTER, J. A., PINEDA, R., MOIR, R. D., LU, S. Q., BURTON, M. A., GHOSH, J. G., ERICSSON, M., SOSCIA, S. J., MOCOFANESCU, A., FOLKERTH, R. D., ROBB, R. M., KUSZAK, J. R., CLARK, J. I., TANZI, R. E., HUNTER, D. G., & GOLDSTEIN, L. E. (2010). Alzheimer's Disease Amyloid-beta Links Lens and Brain Pathology in Down Syndrome. *Plos One*, 5(5).
- MOORE, C. S. (2006). Postnatal lethality and cardiac anomalies in the Ts65Dn Down Syndrome mouse model. *Mammalian Genome*, 17(10), 1005-1012.
- MORICE, E., ANDREAE, L. C., COOKE, S. F., VANES, L., FISHER, E. M. C., TYBULEWICZ, V. L. J., & BLISS, T. V. P. (2008). Preservation of long-term memory and synaptic plasticity despite short-term impairments in the Tc1 mouse model of Down syndrome. *Learning & Memory*, 15(7), 492-500.
- MORRIS, C. R., HAIGH, S., CUTHBERT, G., CROSIER, M., HARDING, F., & WOLSTENHOLME, J. (2012). Origin of trisomy: no evidence to support the ovarian mosaicism theory. *Prenatal Diagnosis*, 32(7), 668-673.
- MORRIS, R. (1984). DEVELOPMENTS OF A WATER-MAZE PROCEDURE FOR STUDYING SPATIAL-LEARNING IN THE RAT. *Journal of Neuroscience Methods*, 11(1), 47-60.
- MORRISON, L. D., SMITH, D. D., & KISH, S. J. (1996). Brain S-Adenosylmethionine levels are severely decreased in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 67(3), 1328-1331.
- MOSER, E. I. (1996). Altered inhibition of dentate granule cells during spatial learning in an exploration task. *J Neurosci*, 16(3), 1247-1259.

- MOY, S. S., NADLER, J. J., PEREZ, A., BARBARO, R. P., JOHNS, J. M., MAGNUSON, T. R., PIVEN, J., & CRAWLEY, J. N. (2004). Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain and Behavior*, 3(5), 287-302.
- MOY, S. S., NADLER, J. J., YOUNG, N. B., PEREZ, A., HOLLOWAY, L. P., BARBARO, R. P., BARBARO, J. R., WILSON, L. M., THREADGILL, D. W., LAUDER, J. M., MAGNUSON, T. R., & CRAWLEY, J. N. (2007). Mouse behavioral tasks relevant to autism: Phenotypes of 10 inbred strains. *Behavioural Brain Research*, 176(1), 4-20.
- MUDD, S. H., SKOVBY, F., LEVY, H. L., PETTIGREW, K. D., WILCKEN, B., PYERITZ, R. E., ANDRIA, G., BOERS, G. H. J., BROMBERG, I. L., CERONE, R., FOWLER, B., GROBE, H., SCHMIDT, H., & SCHWEITZER, L. (1985). THE NATURAL-HISTORY OF HOMOCYSTINURIA DUE TO CYSTATHIONINE BETA-SYNTASE DEFICIENCY. *American Journal of Human Genetics*, 37(1), 1-31.
- NADLER, J. J., ZOU, F., HUANG, H. W., MOY, S. S., LAUDER, J., CRAWLEY, J. N., THREADGILL, D. W., WRIGHT, F. A., & MAGNUSON, T. R. (2006). Large-scale gene expression differences across brain regions and inbred strains correlate with a behavioral phenotype. *Genetics*, 174(3), 1229-1236.
- NAGAI, Y., TSUGANE, M., OKA, J. I., & KIMURA, H. (2004). Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *Faseb Journal*, 18(1), 557-+.
- NICODEMUS, K. K., CALLICOTT, J. H., HIGIER, R. G., LUNA, A., NIXON, D. C., LIPSKA, B. K., VAKKALANKA, R., GIEGLING, I., RUJESCU, D., ST CLAIR, D., MUGLIA, P., SHUGART, Y. Y., & WEINBERGER, D. R. (2010). Evidence of statistical epistasis between DISC1, CIT and NDEL1 impacting risk for schizophrenia: biological validation with functional neuroimaging. *Hum Genet*, 127(4), 441-452.
- O'DOHERTY, A., RUF, S., MULLIGAN, C., HILDRETH, V., ERRINGTON, M. L., COOKE, S., SESAY, A., MODINO, S., VANES, L., HERNANDEZ, D., LINEHAN, J. M., SHARPE, P. T., BRANDNER, S., BLISS, T. V., HENDERSON, D. J., NIZETIC, D., TYBULEWICZ, V. L., & FISHER, E. M. (2005a). An aneuploid mouse strain carrying human chromosome 21 with Down syndrome phenotypes. *Science*, 309(5743), 2033-2037.
- O'DOHERTY, A., RUF, S., MULLIGAN, C., HILDRETH, V., ERRINGTON, M. L., COOKE, S., SESAY, A., MODINO, S., VANES, L., HERNANDEZ, D., LINEHAN, J. M., SHARPE, P. T., BRANDNER, S., BLISS, T. V. P., HENDERSON, D. J., NIZETIC, D., TYBULEWICZ, V. L. J., & FISHER, E. M. C. (2005b). An aneuploid mouse strain carrying human chromosome 21 with Down syndrome phenotypes. *Science*, 309(5743), 2033-2037.
- OLSON, L. E., RICHTSMIEIER, J. T., LESZL, J., & REEVES, R. H. (2004). A chromosome 21 critical region does not cause specific down syndrome phenotypes. *Science*, 306(5696), 687-690.
- OLSON, L. E., ROPER, R. J., SENGSTAKEN, C. L., PETERSON, E. A., AQUINO, V., GALDZICKI, Z., SIAREY, R., PLETNIKOV, M., MORAN, T. H., & REEVES, R. H. (2007). Trisomy for the Down syndrome 'critical region' is necessary but not sufficient for brain phenotypes of trisomic mice. *Human Molecular Genetics*, 16(7), 774-782.
- PASCALIS, O., & BACHEVALIER, J. (1999). Neonatal aspiration lesions of the hippocampal formation impair visual recognition memory when assessed by paired-comparison task but not by delayed nonmatching-to-sample task. *Hippocampus*, 9(6), 609-616.
- PAUL, B. D., & SNYDER, S. H. (2012). H2S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(8), 499-507.
- PENNINGTON, B. F., MOON, J., EDGIN, J., STEDRON, J., & NADEL, L. (2003). The neuropsychology of Down syndrome: Evidence for hippocampal dysfunction. *Child Development*, 74(1), 75-93.
- PEREIRA, P. L., MAGNOL, L., SAHUN, I., BRAULT, V., DUCHON, A., PRANDINI, P., GRUART, A., BIZOT, J. C., CHADEFaux-VEKEMANS, B., DEUTSCH, S., TROVERO, F., DELGADO-GARCIA, J. M., ANTONARAKIS, S. E., DIERSSEN, M., & HERAULT, Y. (2009). A new mouse model for the trisomy of the Abcg1-U2af1 region reveals the complexity of the combinatorial genetic code of down syndrome. *Human Molecular Genetics*, 18(24), 4756-4769.
- PIERCE, K., & COURCHESNE, E. (2001). Evidence for a cerebellar role in reduced exploration and stereotyped behavior in autism. *Biological Psychiatry*, 49(8), 655-664.

- PODDAR, R., SIVASUBRAMANIAN, N., DIBELLO, P. M., ROBINSON, K., & JACOBSEN, D. W. (2001). Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells - Implications for vascular disease. *Circulation*, *103*(22), 2717-2723.
- PRASHER, V., & GOMEZ, G. (2007). Natural history of thyroid function in adults with Down syndrome - 10-year follow-up study. *Journal of Intellectual Disability Research*, *51*, 312-317.
- PRASHER, V., NINAN, S., & HAQUE, S. (2011). Fifteen-year follow-up of thyroid status in adults with Down syndrome. *Journal of Intellectual Disability Research*, *55*, 392-396.
- PUESCHEL, S. M., LOUIS, S., & MCKNIGHT, P. (1991). SEIZURE DISORDERS IN DOWN-SYNDROME. *Archives of Neurology*, *48*(3), 318-320.
- QU, K., CHEN, C., HALLIWELL, B., MOORE, P. K., & WONG, P. T. H. (2006). Hydrogen sulfide is a mediator of cerebral ischemic damage. *Stroke*, *37*(3), 889-893.
- QU, K., LEE, S. W., BIAN, J. S., LOW, C. M., & WONG, P. T. H. (2008). Hydrogen sulfide: Neurochemistry and neurobiology. *Neurochemistry International*, *52*(1-2), 155-165.
- QUINTERO-RIVERA, F., SHARIFI-HANNAUER, P., & MARTINEZ-AGOSTO, J. A. (2010). Autistic and Psychiatric Findings Associated With the 3q29 Microdeletion Syndrome: Case Report and Review. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *152A*(10), 2459-2467.
- RACHIDI, M., DELEZOIDE, A. L., DELABAR, J. M., & LOPES, C. (2009). A quantitative assessment of gene expression (QAGE) reveals differential overexpression of DOPEY2, a candidate gene for mental retardation, in Down syndrome brain regions. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *27*(4), 393-398.
- RAHMANI, Z., BLOUIN, J. L., CREAUGOLDBERG, N., WATKINS, P. C., MATTEI, J. F., POISSONNIER, M., PRIEUR, M., CHETTOUH, Z., NICOLE, A., AURIAS, A., SINET, P. M., & DELABAR, J. M. (1989). CRITICAL ROLE OF THE D21S55 REGION ON CHROMOSOME-21 IN THE PATHOGENESIS OF DOWN SYNDROME. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(15), 5958-5962.
- RAVEAU, M., LIGNON, J. M., NALESSO, V., DUCHON, A., GRONER, Y., SHARP, A. J., DEMBELE, D., BRAULT, V., & HERAULT, Y. (2012). The App-Runx1 Region Is Critical for Birth Defects and Electrocardiographic Dysfunctions Observed in a Down Syndrome Mouse Model. *Plos Genetics*, *8*(5).
- RAVEAU, M., LIGNON, J. M., NALESSO, V., DUCHON, A., GRONER, Y., SHARP, A. J., DEMBELE, D., BRAULT, V., & HÉRAULT, Y. (2012). The app-runx1 region is critical for birth defects and electrocardiographic dysfunctions observed in a down syndrome mouse model. *PLoS Genet*, *8*(5), e1002724.
- REEVES, R. H., IRVING, N. G., MORAN, T. H., WOHN, A., KITT, C., SISODIA, S. S., SCHMIDT, C., BRONSON, R. T., & DAVISSON, M. T. (1995). A MOUSE MODEL FOR DOWN-SYNDROME EXHIBITS LEARNING AND BEHAVIOR DEFICITS. *Nature Genetics*, *11*(2), 177-184.
- REFOJO, D., SCHWEIZER, M., KUEHNE, C., EHRENBERG, S., THOERINGER, C., VOGL, A. M., DEDIC, N., SCHUMACHER, M., VON WOLFF, G., AVRABOS, C., TOUMA, C., ENGBLOM, D., SCHUTZ, G., NAVE, K. A., EDER, M., WOTJAK, C. T., SILLABER, I., HOLSBOER, F., WURST, W., & DEUSSING, J. M. (2011). Glutamatergic and Dopaminergic Neurons Mediate Anxiogenic and Anxiolytic Effects of CRHR1. *Science*, *333*(6051), 1903-1907.
- REFSUM, H., UELAND, P. M., NYGARD, O., & VOLLSET, S. E. (1998). Homocysteine and cardiovascular disease. *Annual Review of Medicine*, *49*, 31-62.
- REGNIER, V., BILLARD, J. M., GUPTA, S., POTIER, B., WOERNER, S., PALY, E., LEDRU, A., DAVID, S., LUILIER, S., BIZOT, J. C., VACANO, G., KRAUS, J. P., PATTERSON, D., KRUGER, W. D., DELABAR, J. M., & LONDON, J. (2012). Brain Phenotype of Transgenic Mice Overexpressing Cystathionine beta-Synthase. *Plos One*, *7*(1).
- REYNOLDS, L. E., WATSON, A. R., BAKER, M., JONES, T. A., D'AMICO, G., ROBINSON, S. D., JOFFRE, C., GARRIDO-URBANI, S., RODRIGUEZ-MANZANEQUE, J. C., MARTINO-ECHARRI, E., AURRAND-LIONS, M., SHEER, D., DAGNA-BRICARELLI, F., NIZETIC, D., MCCABE, C. J., TURNELL, A. S., KERMORGANT, S., IMHOF, B. A., ADAMS, R., FISHER, E. M. C., TYBULEWICZ, V. L. J., HART, I.

- R., & HODIVALA-DILKE, K. M. (2010). Tumour angiogenesis is reduced in the Tc1 mouse model of Down's syndrome. *Nature*, *465*(7299), 813-U813.
- RICHTSMIEIER, J. T., ZUMWALT, A., CARLSON, E. J., EPSTEIN, C. J., & REEVES, R. H. (2002). Craniofacial phenotypes in segmentally trisomic mouse models for Down syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, *107*(4), 317-324.
- ROBERSON, E. D., WOHLER, E. S., HOOVER-FONG, J. E., LISI, E., STEVENS, E. L., THOMAS, G. H., LEONARD, J., HAMOSH, A., & PEVSNER, J. (2011). Genomic analysis of partial 21q monosomies with variable phenotypes. *Eur J Hum Genet*, *19*(2), 235-238.
- ROIZEN, N. J. (2001). Down syndrome: Progress in research. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, *7*(1), 38-44.
- RUEDA, N., LLORENS-MARTIN, M., FLOREZ, J., VALDIZAN, E., BANERJEE, P., TREJO, J. L., & MARTINEZ-CUE, C. (2010). Memantine Normalizes Several Phenotypic Features in the Ts65Dn Mouse Model of Down Syndrome. *Journal of Alzheimers Disease*, *21*(1), 277-290.
- RUSTAY, N. R., WAHLSTEN, D., & CRABBE, J. C. (2003). Influence of task parameters on rotarod performance and sensitivity to ethanol in mice. *Behavioural Brain Research*, *141*(2), 237-249.
- RÉGNIER, V., BILLARD, J. M., GUPTA, S., POTIER, B., WOERNER, S., PALY, E., LEDRU, A., DAVID, S., LUILIER, S., BIZOT, J. C., VACANO, G., KRAUS, J. P., PATTERSON, D., KRUGER, W. D., DELABAR, J. M., & LONDON, J. (2012). Brain phenotype of transgenic mice overexpressing cystathionine β -synthase. *PLoS One*, *7*(1), e29056.
- SAGO, H., CARLSON, E. J., SMITH, D. J., KILBRIDGE, J., RUBIN, E. M., MOBLEY, W. C., EPSTEIN, C. J., & HUANG, T. T. (1998). Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(11), 6256-6261.
- SAGO, H., CARLSON, E. J., SMITH, D. J., RUBIN, E. M., CRNIC, L. S., HUANG, T. T., & EPSTEIN, C. J. (2000). Genetic dissection of region associated with behavioral abnormalities in mouse models for Down syndrome. *Pediatric Research*, *48*(5), 606-613.
- SAHUN, I., DELGADO-GARCIA, J. M., AMADOR-ARJONA, A., GIRALT, A., ALBERCH, J., DIERSSEN, M., & GRUART, A. (2007). Dissociation between CA3-CA1 synaptic plasticity and associative learning in TgNTRK3 transgenic mice. *Journal of Neuroscience*, *27*(9), 2253-2260.
- SAHÚN, I., DELGADO-GARCÍA, J. M., AMADOR-ARJONA, A., GIRALT, A., ALBERCH, J., DIERSSEN, M., & GRUART, A. (2007). Dissociation between CA3-CA1 synaptic plasticity and associative learning in TgNTRK3 transgenic mice. *J Neurosci*, *27*(9), 2253-2260.
- SALOMONS, A. R., VAN LUIJK, J., REINDERS, N. R., KIRCHHOFF, S., ARNDT, S. S., & OHL, F. (2010). Identifying emotional adaptation: behavioural habituation to novelty and immediate early gene expression in two inbred mouse strains. *Genes Brain and Behavior*, *9*(1), 1-10.
- SANDERSON, D. J., HINDLEY, E., SMEATON, E., DENNY, N., TAYLOR, A., BARKUS, C., SPRENGEL, R., SEEBURG, P. H., & BANNERMAN, D. M. (2011). Deletion of the GluA1 AMPA receptor subunit impairs recency-dependent object recognition memory. *Learning & Memory*, *18*(3), 181-190.
- SCHMEISSER, M. J., EY, E., WEGENER, S., BOCKMANN, J., STEMPEL, A. V., KUEBLER, A., JANSSEN, A. L., UDVARDI, P. T., SHIBAN, E., SPILKER, C., BALSCHUN, D., SKRYABIN, B. V., DIECK, S. T., SMALLA, K. H., MONTAG, D., LEBLOND, C. S., FAURE, P., TORQUET, N., LE SOURD, A. M., TORO, R., GRABRUCKER, A. M., SHOICHET, S. A., SCHMITZ, D., KREUTZ, M. R., BOURGERON, T., GUNDELFINGER, E. D., & BOECKERS, T. M. (2012). Autistic-like behaviours and hyperactivity in mice lacking ProSAP1/Shank2. *Nature*, *486*(7402), 256-+.
- SCOTT, H. S., KUDOH, J., WATTENHOFER, M., SHIBUYA, K., BERRY, A., CHRAST, R., GUIPPONI, M., WANG, J., KAWASAKI, K., ASAKAWA, S., MINOSHIMA, S., YOUNUS, F., MEHDI, S. Q., RADHAKRISHNA, U., PAPASAVVAS, M. P., GEHRIG, C., ROSSIER, C., KOROSTISHEVSKY, M., GAL, A., SHIMIZU, N., BONNE-TAMIR, B., & ANTONARAKIS, S. E. (2001). Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. *Nature Genetics*, *27*(1), 59-63.
- SEREGAZA, Z., ROUBERTOUX, P. L., JAMON, M., & SOUMIREU-MOURAT, B. (2006). Mouse models of cognitive disorders in trisomy 21: A review. *Behavior Genetics*, *36*(3), 387-404.

- SHELDON, A. B. (1969). PREFERENCE FOR FAMILIAR VERSUS NOVEL STIMULI AS A FUNCTION OF FAMILIARITY OF ENVIRONMENT. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 67(4), 516-&.
- SHOTT, S. R., AMIN, R., CHINI, B., HEUBI, C., HOTZE, S., & AKERS, R. (2006). Obstructive sleep apnea - Should all children with Down syndrome be tested? *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, 132(4), 432-436.
- SIAREY, R. J., STOLL, J., RAPOPORT, S. I., & GALDZICKI, Z. (1997). Altered long-term potentiation in the young and old Ts65Dn mouse, a model for Down Syndrome. *Neuropharmacology*, 36(11-12), 1549-1554.
- SIMON, A.-M., SCHIAPPARELLI, L., SALAZAR-COLOCHO, P., CUADRADO-TEJEDOR, M., ESCRIBANO, L., DE MATURANA, R. L., DEL RIO, J., PEREZ-MEDIAVILLA, A., & FRECHILLA, D. (2009). Overexpression of wild-type human APP in mice causes cognitive deficits and pathological features unrelated to A beta levels. *Neurobiology of Disease*, 33(3).
- SINGH, S., & BANERJEE, R. (2011). PLP-dependent H₂S biogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1814(11), 1518-1527.
- SMIGIELSKA-KUZIA, J., BOCKOWSKI, L., SOBANIEC, W., SENDROWSKI, K., OLCHOWIK, B., CHOLEWA, M., LUKASIEWICZ, A., & LEBKOWSKA, U. (2011). A volumetric magnetic resonance imaging study of brain structures in children with Down syndrome. *Neurologia I Neurochirurgia Polska*, 45(4), 363-369.
- SMULDERS, Y. M., & BLOM, H. J. (2011). The homocysteine controversy. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(1), 93-99.
- SPERLING, K., NEITZEL, H., & SCHERB, H. (2012). Evidence for an Increase in Trisomy 21 (Down Syndrome) in Europe after the Chernobyl Reactor Accident. *Genetic Epidemiology*, 36(1), 48-55.
- SQUIRE, L. R., WIXTED, J. T., & CLARK, R. E. (2007). Recognition memory and the medial temporal lobe: A new perspective. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(11), 872-883.
- STASKO, M. R., & COSTA, A. C. S. (2004). Experimental parameters affecting the Morris water maze performance of a mouse model of Down syndrome. *Behavioural Brain Research*, 154(1), 1-17.
- STEFANIDIS, K., BELITSOS, P., FOTINOS, A., MAKRIS, N., LOUTRADIS, D., & ANTSAKLIS, A. (2011). Causes of infertility in men with Down syndrome. *Andrologia*, 43(5), 353-357.
- STRICK, P. L., DUM, R. P., & FIEZ, J. A. (2009). Cerebellum and Nonmotor Function. *Annual Review of Neuroscience*, 32, 413-434.
- SUMARSONO, S. H., WILSON, T. J., TYMMS, M. J., VENTER, D. J., CORRICK, C. M., KOLA, R., LAHOUD, M. H., PAPAS, T. S., SETH, A., & KOLA, I. (1996). Down's syndrome-like skeletal abnormalities in Ets2 transgenic mice. *Nature*, 379(6565), 534-537.
- TAUB, J. W., GE, Y., HUANG, X., STOUT, M. L., DUTCHER, J. A., MOHAMMAD, R. M., RAVINDRANATH, Y., & MATHERLY, L. H. (1999). Factors regulating expression of the chromosome 21-localized gene, cystathionine beta synthase, in down syndrome myeloblasts and its role in the high event-free survival rates of down syndrome patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 94(10), 382A-382A.
- THOMPSON, R. F., & SPENCER, W. A. (1966). HABITUATION - A MODEL PHENOMENON FOR STUDY OF NEURONAL SUBSTRATES OF BEHAVIOR. *Psychological Review*, 73(1), 16-&.
- UMLAUF, D., FRASER, P., & NAGANO, T. (2008). The role of long non-coding RNAs in chromatin structure and gene regulation: variations on a theme. *Biological Chemistry*, 389(4), 323-331.
- VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A., & SPELEMAN, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7).
- WACHTER, T., ROHRICH, S., FRANK, A., MOLINA-LUNA, K., PEKANOVIC, A., HERTLER, B., SCHUBRING-GIESE, M., & LUFT, A. R. (2010). Motor skill learning depends on protein synthesis in the dorsal striatum after training. *Experimental Brain Research*, 200(3-4), 319-323.
- WALD, D. S., LAW, M., & MORRIS, J. K. (2002). Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *British Medical Journal*, 325(7374), 1202-1206K.

- WALL, P. M., & MESSIER, C. (2002). Infralimbic kappa opioid and muscarinic M1 receptor interactions in the concurrent modulation of anxiety and memory. *Psychopharmacology*, *160*(3), 233-244.
- WANG, L. Q., JHEE, K. H., HUA, X., DIBELLO, P. M., JACOBSEN, D. W., & KRUGER, W. D. (2004). Modulation of cystathionine beta-synthase level regulates total serum homocysteine in mice. *Circulation Research*, *94*(10), 1318-1324.
- WANG, R. (2011). Signaling pathways for the vascular effects of hydrogen sulfide. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, *20*(2), 107-112.
- WATANABE, M., OSADA, J., ARATANI, Y., KLUCKMAN, K., REDDICK, R., MALINOW, M. R., & MAEDA, N. (1995). MICE DEFICIENT IN CYSTATHIONINE BETA-SYNTASE - ANIMAL-MODELS FOR MILD AND SEVERE HOMOCYST(E)INEMIA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(5), 1585-1589.
- WHITLOCK, J. R., HEYNEN, A. J., SHULER, M. G., & BEAR, M. F. (2006a). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, *313*(5790), 1093-1097.
- WHITLOCK, J. R., HEYNEN, A. J., SHULER, M. G., & BEAR, M. F. (2006b). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, *313*(5790), 1093-1097.
- WIRTZ, S., & SCHUELKE, M. (2011). Region-Specific Expression of Mitochondrial Complex I Genes during Murine Brain Development. *Plos One*, *6*(4).
- WOHR, M., ROULLET, F. I., HUNG, A. Y., SHENG, M., & CRAWLEY, J. N. (2011). Communication Impairments in Mice Lacking Shank1: Reduced Levels of Ultrasonic Vocalizations and Scent Marking Behavior. *Plos One*, *6*(6).
- WOLVETANG, E. J., BRADFIELD, O. M., HATZISTAVROU, T., CRACK, P. J., BUSCIGLIO, J., KOLA, I., & HERTZOG, P. J. (2003). Overexpression of the chromosome 21 transcription factor Ets2 induces neuronal apoptosis. *Neurobiology of Disease*, *14*(3), 349-356.
- WONG, P. T. H., QU, K., CHIMON, G. N., SEAH, A. B. H., CHANG, H. M., WONG, M. C., NG, Y. K., RUMPEL, H., HALLIWELL, B., & CHEN, C. (2006). High plasma cyst(e)ine level may indicate poor clinical outcome in patients with acute stroke: Possible involvement of hydrogen sulfide. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *65*(2), 109-115.
- XIAO, J. F., JIANG, H., ZHANG, R., FAN, G. P., ZHANG, Y., JIANG, D. S., & LI, H. L. (2012). Augmented Cardiac Hypertrophy in Response to Pressure Overload in Mice Lacking ELTD1. *Plos One*, *7*(5).
- XIE, Z., CAHILL, M. E., RADULOVIC, J., WANG, J., CAMPBELL, S. L., MILLER, C. A., SWEATT, J. D., & PENZES, P. (2011). Hippocampal phenotypes in kalirin-deficient mice. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *46*(1).
- YU, T., LI, Z. Y., JIA, Z. P., CLAPCOTE, S. J., LIU, C. H., LI, S. M., ASRAR, S., PAO, A., CHEN, R. Q., FAN, N., CARATTINI-RIVERA, S., BECHARD, A. R., SPRING, S. S., HENKELMAN, R. M., STOICA, G., MATSUI, S. I., NOWAK, N. J., RODER, J. C., CHEN, C., BRADLEY, A., & YU, Y. E. (2010). A mouse model of Down syndrome trisomic for all human chromosome 21 syntenic regions. *Human Molecular Genetics*, *19*(14), 2780-2791.
- YU, T., LIU, C. H., BELICHENKO, P., CLAPCOTE, S. J., LI, S. M., PAO, A. N., KLESCHVNIKOV, A., BECHARD, A. R., ASRAR, S., CHEN, R. Q., FAN, N., ZHOU, Z. Y., JIA, Z. P., CHEN, C., RODER, J. C., LIU, B., BALDINI, A., MOBLEY, W. C., & YU, Y. E. (2010). Effects of individual segmental trisomies of human chromosome 21 syntenic regions on hippocampal long-term potentiation and cognitive behaviors in mice. *Brain Research*, *1366*, 162-171.